

Nancy 1971

B. Cabane

THÈSE
PRÉSENTÉE
À L'UNIVERSITÉ DE NANCY
POUR OBTENIR LE
DIPLÔME DE DOCTEUR-INGÉNIEUR
PAR
M. CASANE
NANCY, 1971

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551919_0008

THESE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE DE NANCY I

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR-INGENIEUR

PAR

B.CABANE

--- +++ ---

CONTROLE GENETIQUE ET METABOLIQUE DE LA FORMATION
DES DICETONES VOLATILES CHEZ SACCHAROMYCES CEREVISIAE

--- +++ ---

Soutenue le 21 juin 1971 devant la commission d'examen

- Mr R. GAY, Président
- Mr M. METCHE, Examineur
- Mr CH.A. MASSCHELEIN, Examineur
- Mr CH. ALAIS, Examineur
- Mr P. GALZY, Examineur

A MES PARENTS

A MA FEMME

A MON FILS

AVANT PROPOS

Je suis heureux de remercier Monsieur le Professeur GAY Directeur de l'Ecole Supérieure de Brasserie, Malterie et Biochimie Appliquée de Nancy, de m'avoir vivement encouragé et suivi tout au cours de cette recherche.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur Ch.A.MASSCHELEIN, Professeur au C.E.R.I.A. (Bruxelles) qui a dirigé mon travail. Ses conseils et son assistance amicale m'ont été très bénéfiques. A Monsieur MASSCHELEIN j'associerai Mme Cl.RAMOS-JEUNEHOMME (C.E.R.I.A.) dont l'aide me fut particulièrement précieuse pour la réalisation de ce travail.

J'adresse également à Monsieur M.METCHE Maître de conférences à l'E.N.S.A.I.A. mes bien vifs remerciements pour m'avoir guidé lors de mes débuts et toujours amicalement suivi et conseillé dans ma recherche.

Que Messieurs C.BOURGEOIS et D.THOUVENOT soient particulièrement remerciés pour l'excellente ambiance de travail que j'ai pu trouver avec eux dans le service de Microbiologie de l'E.N.S.A.I.A.

Je remercie enfin d'avoir bien voulu examiner ce travail, Monsieur le Professeur P.GALZY (Chaire de Génétique E.N.S.A. Montpellier) et Monsieur le Professeur Ch.ALAIS (Professeur de biochimie - Université de Nancy I).

ABBREVIATIONS EMPLOYEES

=====

α C.B	α cétobutyrate
α A.L	α acétolactate
α A.H.B.	α acétohydroxybutyrate
A.D.C.	acétyl éthyl carbinol
DA	diacétyle
2-3 B-ol	2-3 butanediol
2-3 P	2-3 pentanodione
2-3 P-ol	2-3 pentanodiol
E ₁	thréonine désaminase
E ₂	acéto-hydroxy-acide-synthétase
E ₃	réducto-isomérase
E ₄	Déhydrase
E ₅	transaminase B
O.P.D.	ortophénylènediamine
D.N.P.	dinitro phényl hydrozone
D.H.S.	éthyl-méthane-sulfonate
T.C.E.P.	1-2-3 Tri (2 cyanoéthoxy) propane

I N T R O D U C T I O N

Le principal facteur de qualité d'une boisson fermentée est sa "flaveur", qui est définie comme étant la sensation olfacto-gustative perçue lors de la consommation de la boisson (24). La "flaveur" est ainsi faite, du goût (substances non volatiles) et de l'arôme (substances volatiles). Aussi la fabrication de ces boissons a-t-elle toujours été soumise à cet impératif : proposer aux consommateurs un produit dont le goût et l'arôme soient les plus agréables possible.

La flaveur est restée longtemps un caractère totalement subjectif ; l'impossibilité de la quantifier a démuné le technicien de moyens d'approche permettant d'en envisager efficacement le contrôle. Dans ces conditions en assurer une production uniforme et prévue semblait difficile. Les techniques analytiques modernes appliquées à ce problème ont permis de concrétiser arôme et goût. Il apparaît que l'importance des différentes substances volatiles est variable quant à leur participation à l'arôme : les travaux de Harrisson (1) ont mis l'accent sur la notion de seuil olfactif de chaque substance volatile et l'incidence de ces seuils dans la constitution d'un arôme.

Les qualités organoleptiques d'une boisson fermentée résultent d'un équilibre complexe (33) entre les effets individuels de chaque substance volatile (arôme) et non

volatile (goût). Dans le cas de l'arôme, l'interprétation correcte d'un chromatogramme, en vue d'un essai d'appréciation olfactive devra faire intervenir nécessairement les seuils de sensibilité de chacune des substances volatiles (2). On peut alors définir un profil de l'arôme d'une boisson fermentée: les travaux de Harrisson (1) sur la bière ont permis une telle approche.

Suomalainen (3) mettait en évidence le rôle essentiel de la levure dans la formation de l'arôme de la bière : la production de substances secondaires volatiles dépend du métabolisme de la levure et dans une mesure moindre de la nature de la matière première dégradée au cours de la fermentation.

Dans le cadre de la fabrication de la bière, si la levure constitue l'élément le plus important pour la genèse de l'arôme, le technicien dispose néanmoins de quelques moyens pour le modifier tels que la variation de facteurs technologiques : température de fermentation, aération, agitation, géométrie des cuves, durée de la garde et de la maturation.... Dans les procédés classiques de fabrication la phase de fermentation secondaire et de maturation permettait d'obtenir un produit de qualité acceptable. Cependant les moyens employés reposaient sur des bases très empiriques. Avec les nouveaux procédés de fabrication qui ont tendance à accélérer la fermentation et à réduire ou à supprimer la phase de maturation, les problèmes de contrôle se posent avec encore plus d'acuité.

Il devenait nécessaire de rechercher un contrôle efficace de l'arôme. Plusieurs auteurs (4,1) ont montré la filiation existant entre arôme d'une part et métabolisme azoté d'autre part. On pouvait envisager le contrôle de l'arôme par action directe au niveau des voies métaboliques ; ainsi Ylänen (6) a utilisé des mutants déréprimés pour la production accrue d'alcools supérieurs avec une souche de *Saccharomyces Yedo*.

Nous avons envisagé dans ce travail la modification du patrimoine génétique de la levure en vue de maîtriser la formation d'un type de composés de l'arôme de la bière : les dicétones volatiles jouant un rôle très important dans l'appréciation olfactive de la bière.

Deux dicétones volatiles : diacétyl et 2-3 pentanedione sont en effet particulièrement néfastes dans la bière finie. Leurs seuils de sensibilité sont très faibles et leur participation à l'arôme devient désagréable pour des concentrations supérieures à 0,3 ppm.

Des progrès récents (7,8) ont été effectués dans la connaissance de la formation du diacétyl. En recherchant une démonstration absolue du mode de formation du diacétyl et en mettant en évidence celui de la 2-3 pentanedione au niveau de souches haploïdes de *Saccharomyces Cerevisiae*, nous avons abordé le problème de production de souches améliorées à caractère industriel.

III - CONNAISSANCES ACTUELLES CONCERNANT LE MECANISME DE FORMATION DES DICETONES VOLATILES

Les observations faites en brasserie possèdent de manière précise le problème de formation du diacétyl et de la 2-3 pentanedione.

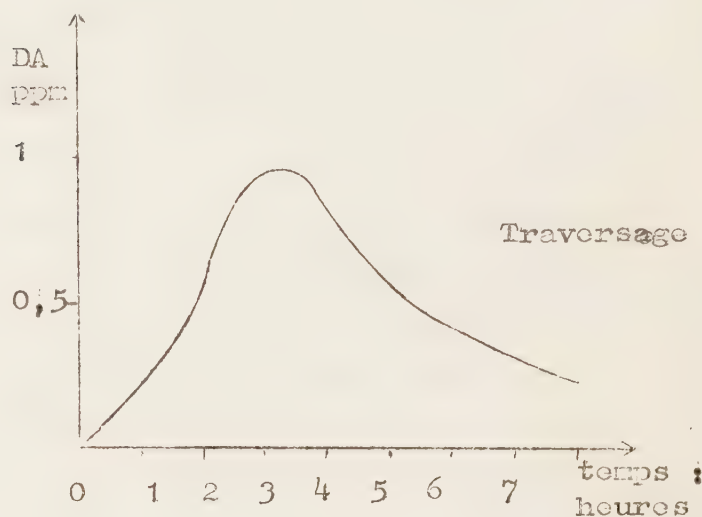
En cours de fermentation l'"odeur de diacétyl" est souvent imperceptible, bien que le dosage global (par distillation) en indique des quantités décelables (2 ppm). Cependant l'addition de diacétyl même en faible quantité (0,3 ppm) à ces fermentations suffit pour communiquer à la bière une odeur désagréable. (9)

D'autre part lors de la fermentation principale on observe un maximum de production (1 à 2 ppm) de dicétones volatiles ou de substances de même comportement analytique. (Dans les méthodes d'analyses comportant une distillation à 100°C).

Le processus de réduction enzymatique du diacétyl en acétylméthylcarbinol et probablement de la 2-3 pentanedione en acétyléthylcarbinol commence dès la fermentation principale. Le terme ultime de cette réduction est la formation respectivement de 2-3 butanediol et de 2-3 pentanediol. Il est important de signaler que ces derniers constituants n'affectent pas considérablement les qualités organoleptiques de la bière. Cette réduction constitue donc une phase décisive dans la maturation de la bière.

Production de dicétones volatiles
au cours d'une fermentation princi-
pale normale. (D'après Tran Hien)(18)

On remarquera dans la Figure ci-contre que la teneur en diacétyle de la bière au traversage dépend non seulement de la quantité de diacétyle formé mais également et surtout de l'emplacement du maximum en fonction de l'atténuation. Un glissement de ce maximum vers la fin de la fermentation risquerait en effet d'entraîner des teneurs anormalement élevées de dicétones volatiles dans le produit fini.



Il est à remarquer cependant que l'odeur de diacétyle peut être plus ou moins masquée selon le type de bière fabriquée. Ainsi les bières de fermentation haute supportent couramment des teneurs supérieures à 1 ppm.

Enfin plusieurs auteurs (10,11,7) ont remis en question la validité des dosages de diacétyle employant une distillation préalable du milieu fermenté. L'emploi de techniques analytiques nouvelles (11,12,13,19) devait permettre d'avancer de nouvelles propositions concernant le mécanisme de formation des dicétones volatiles.

Certains auteurs (14,15,16,17) associent dans un mécanisme commun la formation du diacétyle et de l'acétoïne comme c'est effectivement le cas chez certaines bactéries.

D'autres auteurs (8,7) proposent l'hypothèse ^{*} du diacétyle par une voie non enzymatique à partir d'un précurseur non volatil et instable dans certaines conditions de fermentation (pH, T°, rH) de la formation

Certains auteurs proposent enfin un mécanisme de formation directe du diacétyle au départ de l'acétyl -CoA. (20,25).

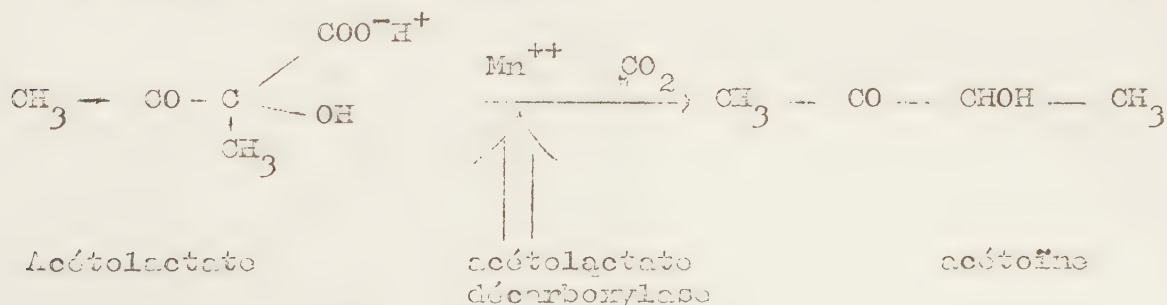
En vue de choisir une voie de travail, nous allons examiner ces trois groupes d'hypothèses.

A) FORMATION DE L'ACÉTOÏNE

Nous envisageons le problème de la formation de l'acétoïne étant donné que ce métabolite a été considéré par certains auteurs (14,15,16,17) comme le précurseur direct du diacétyle: L'acétoïne est transformée en diacétyle par intervention d'une acétoïne déshydrogénase.

a) Formation chez les bactéries

L'acétoïne est formée à partir de l' A.L par décarboxylation enzymatique ; Juni (22) et Singer (23) ont montré l'existence d'une ~~de~~carboxylase.

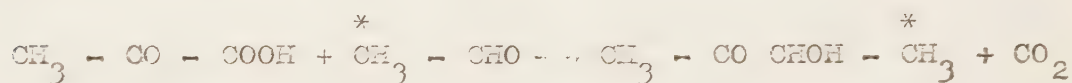


Cette voie de formation de l'acétoïne n'est pas la seule ; il a été montré que certains aérobactères (26) ainsi que *E. Coli* (13) forment l'acétoïne à partir d'acétaldéhyde libre et de pyruvate. Ce dernier mode de formation est celui proposé chez la levure par Juni (27).

Une voie de formation accessoire de l'acétoïne utilise le diacétyl comme précurseur : le diacétyl est réduit en acétoïne puis en 2-3 butanediol. (28,29,30). On peut penser que d'une manière analogue la 2-3 pentanedione dicétoïne homologue supérieure du diacétyl est réduite finalement en 2-3 pentanediol.

b) Formation chez la levure

Juni (22) montre que l'acétoïne provient d'une condensation d'une molécule de pyruvate avec une molécule d'acétaldéhyde activé ; cet auteur a mis en évidence la réaction globale suivante :



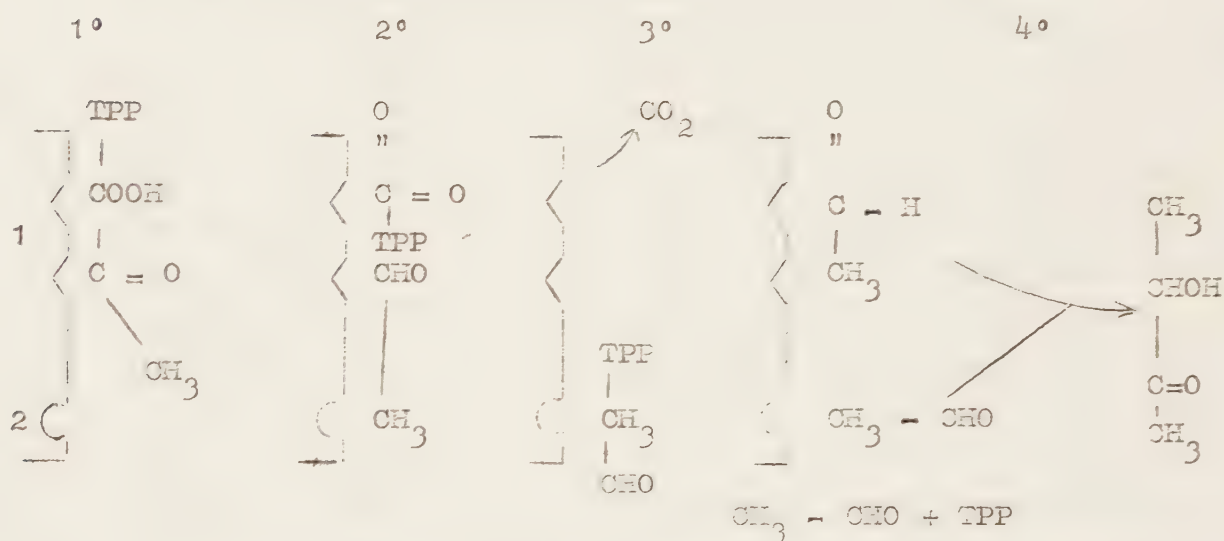
Le CO_2 formé provient du pyruvate.

Juni (22) précise son mécanisme de formation de l'acétoïne. Celui-ci fait intervenir l' α -carboxylase, un enzyme à deux sites réactionnels.

Les étapes sont les suivantes :

- 1) sur le 1° site, décarboxylation du pyruvate en un complexe "acétaldéhyde-TPP".
- 2) sur le 2° site, transfert irréversible de ce complexe.
- 3) dissociation du complexe en acétaldéhyde libre et en TPP.
- 4) Formation d'acétoïne par condensation de la molécule du 2° site avec une nouvelle molécule fixée sur le 1° site.

Schéma



Il convient toutefois d'ajouter que complémentirement à ce mécanisme de formation, il faut prendre en considération le fait que l'acétoïne peut également être formée à partir du diacétyls par réduction enzymatique (30).

B) FORMATION DU DIACÉTYLE

Chez les bactéries et les levures

Par oxydation de l'acétone

Plusieurs auteurs ont proposé un mécanisme de formation par oxydation enzymatique de l'acétone : chez les bactéries lactiques (31), chez *Pseudomonas* (32) et chez les levures (15,16;17).

Par formation directe à partir de l'acétyl CoA

Speckmann et Collins en 1968 (28) mettaient en évidence la formation directe du diacétyl par condensation de l'acétyl CoA avec le complexe intermédiaire acétaldéhyde-TPP chez *S.diacetylactis* et *L.Citrovorum*. Chuang et Collins (25) proposaient ensuite un mécanisme analogue chez la levure. Ces auteurs mettaient également en évidence l'action stimulatrice de l'acide panthoténique sur la production de diacétyl. Ces mêmes auteurs ne parvenaient pas à expliquer le rôle régulateur de la valine sur la formation des diacétones volatiles qui avait été mis en évidence par Owades (14) et Portno (34). Un tel rôle pourrait être cependant expliqué par l'hypothèse de Grinbergs et coll 1968 (20) qui proposent que l'acétohydroxycarboxylase catalyse la formation directe du diacétyl à partir du pyruvate et de l'acétyl-CoA.

Par formation enzymatique d'un précurseur instable dans le milieu dans certaines conditions, de t°, pH et pH

Lewis (35) montrait chez la levure la formation de l'acétyl (voir Fig. n° 1) métabolite intermédiaire de la chaîne de biosynthèse de la valine.

Ce cétohydroxyacide est excrété par la levure dans le milieu fermentaire (30) et se décompose à pH 4,5 en diacétyl (7) et en acide formique (63). L' α acétohydroxyacide synthétase (catalysant la condensation du pyruvate et de l'acétaldéhyde-TPP en α AL) est à la fois réprimée et rétroinhibée par la valine (36).

T.Inoué (8) a mis en évidence la présence de l' α AL dans le milieu ainsi que le rôle du pH sur sa décomposition.

DISCUSSION

Des trois hypothèses formulées précédemment deux sont à retenir. En effet l'acétoïne comme précurseur direct du diacétyl ne pouvait pas être envisagé, étant donné que la levure s'avère incapable de l'oxyder. (Portno 34)

La formation directe du diacétyl serait à prendre en considération à condition de pouvoir expliquer le rôle régulateur de la valine. L'hypothèse de Grinbergs pourrait alors être retenue quoique l' α acétohydroxyacide synthétase semble faire intervenir un produit intermédiaire : l' α AL qui de ce fait éliminerait l'hypothèse de la formation directe,

Les observations suivantes sont par ailleurs en faveur de l'intervention des α cétohydroxyacides comme précurseurs de dicétones:

- la formation du diacétyl se produit à pH faible (voisin de 4,5)
- la formation du diacétyl est favorisée par un pH > 10
- la valine inhibe la formation du diacétyl
- la synthèse de l' α AL est régulée par la valine
- une élévation de température favorise la formation des α dicétones

En conclusion et ceci constituera notre hypothèse de travail :
l' α AL et l' α AHB seraient les précurseurs directs et non enzymatiques du diacétyl et de la 2-3 pentanedione.

Ceci nous a amené à étudier la formation des α cétohydroxyacides dans le cadre de la biosynthèse de la valine et de l'isoleucine.

C) BIOSYNTHÈSE DE LA VALINE ET DE L'ISOLEUCINE ET SA RÉGULATION

1) Biosynthèse : Nous remarquons que la biosynthèse de la valine est parallèle à celle de l'isoleucine (Fig. n°2). L' α acétohydroxyacide synthétase qui catalyse la condensation entre une molécule d'acétaldéhyde provenant du pyruvate et une molécule d' α cétobutyrate est en effet également capable d'effectuer une condensation entre une molécule d'acétaldéhyde et une molécule de pyruvate. Les enzymes E2, E3, E4, et E5 sont commun aux deux chaînes biosynthétiques.

E1	thréonine désaminase
E2	acéto-hydroxy-acide-synthétase
E3	réducto-isonérase
E4	déhydrase
E5	transaminase B

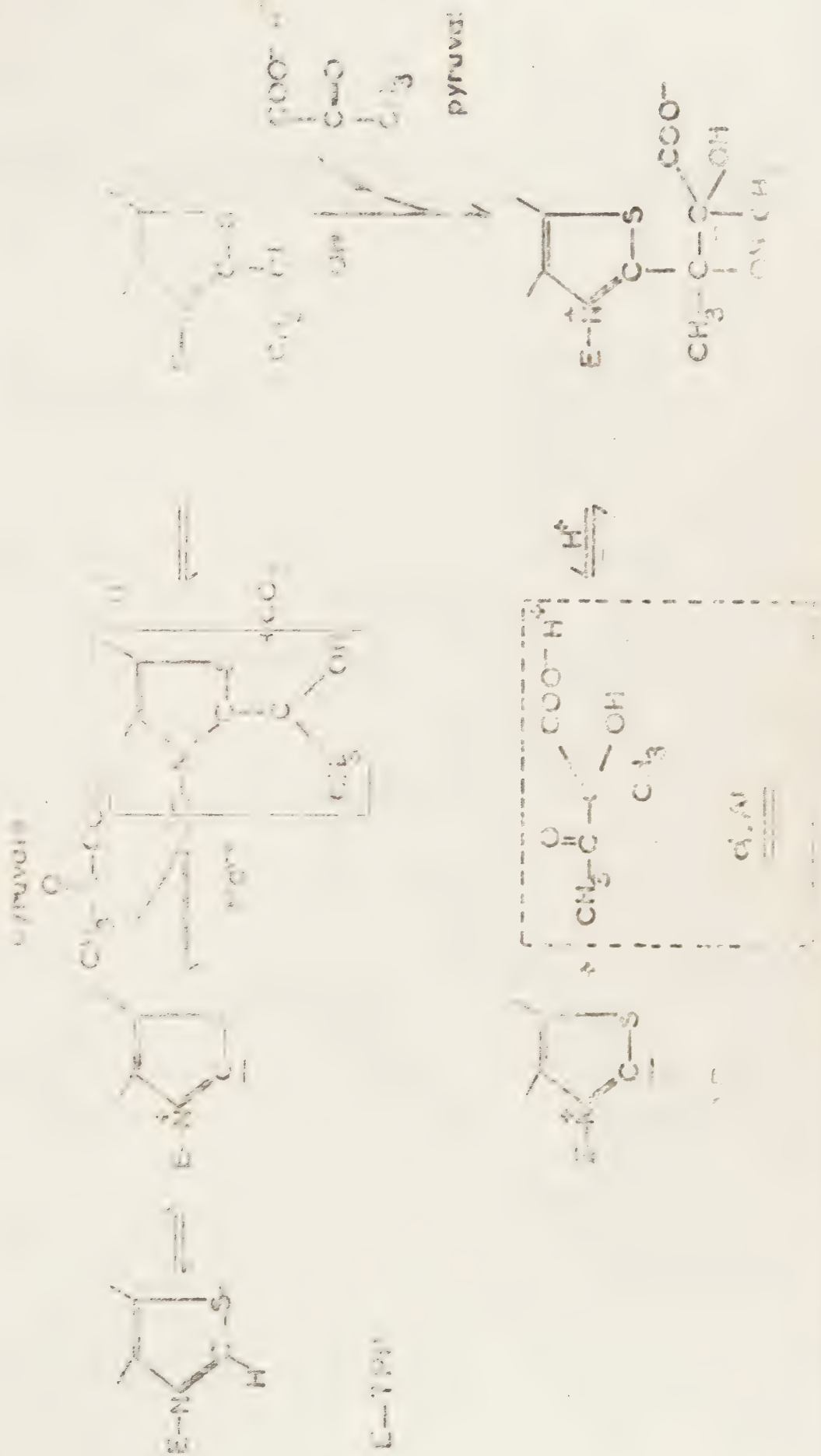
2) Régulation : La régulation porte essentiellement sur E1 et E2 (Fig.n°3)

Thréonine désaminase : (36)

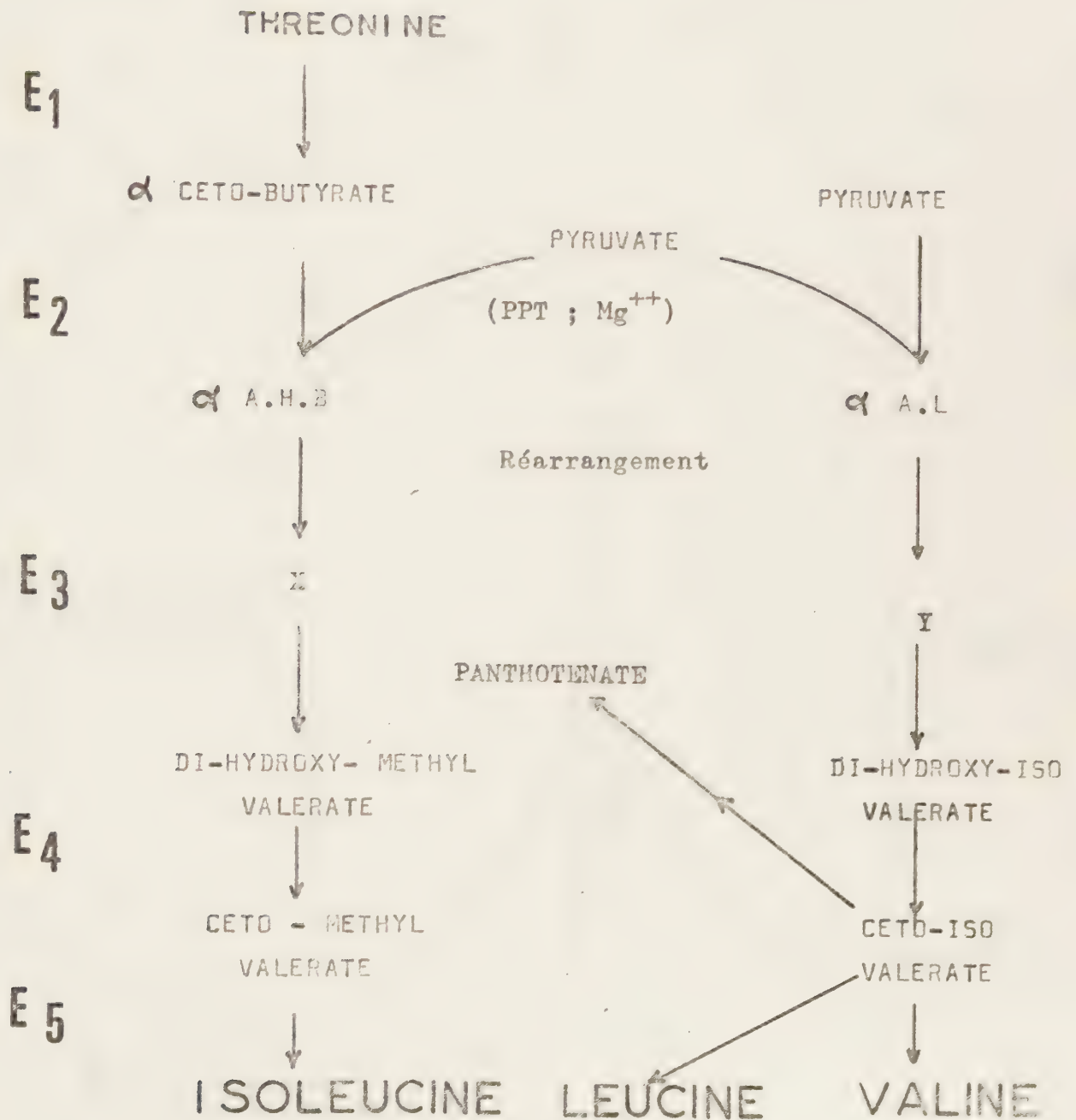
Cette enzyme est inhibée à 100 % par l'isoleucine. Cette inhibition est levée en présence de valine.

La cinétique est sigmoïdienne ; la coopérativité est abolie par des concentrations faibles de valine. (36)

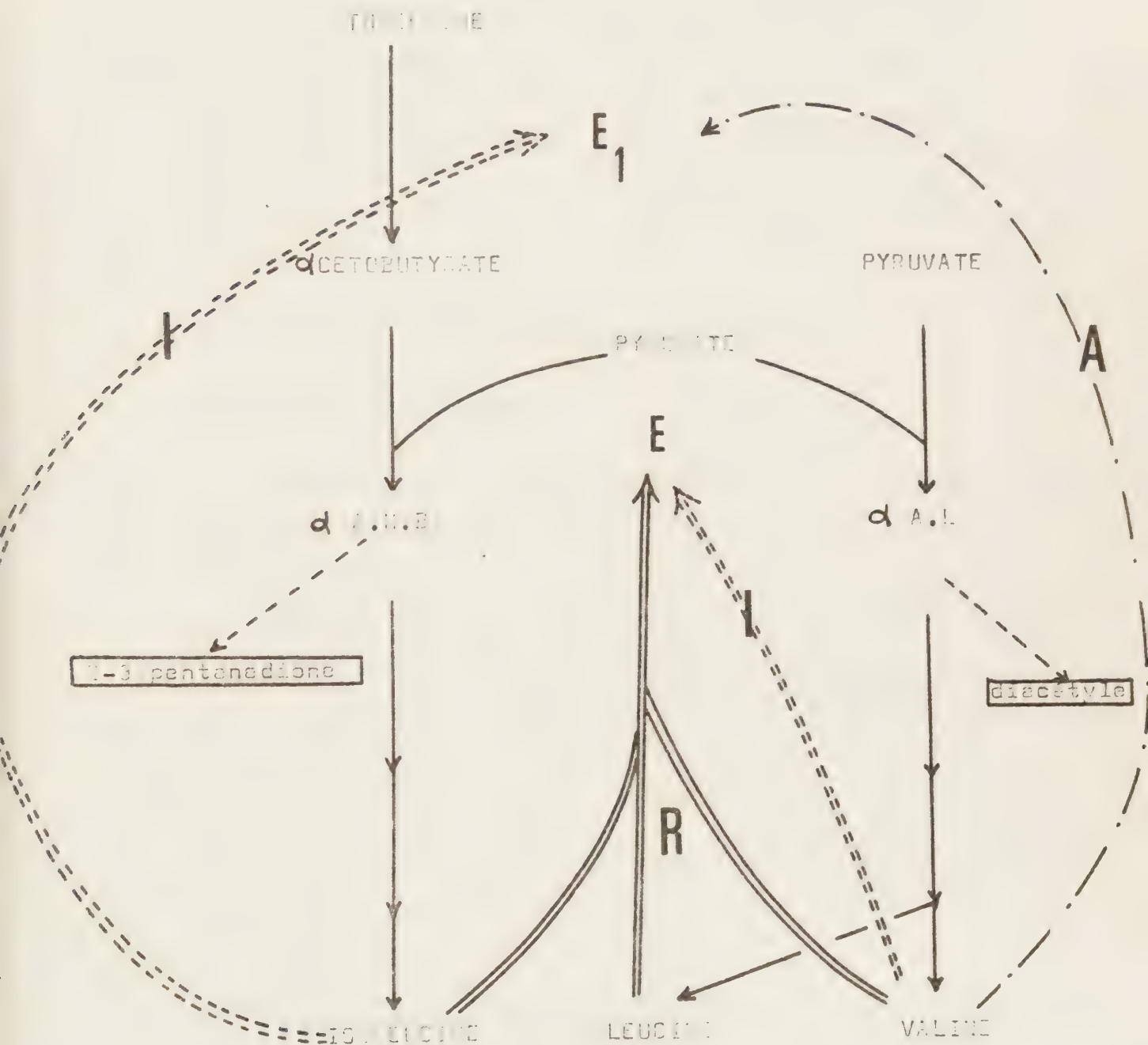
SCHEMA DE FORMATION DE L'ACETOLACTATE (MAL)



BIOSYNTHESE DE LA VALINE DE L'ISOLEUCINE ET DE LA LEUCINE



REGULATIONS DE LA BIOSYNTHESE DE LA VALINE ET DE L'ISOLEUCINE.



A Activation
I Inhibition
R Répression

Acétohydroxyacidsynthétase :

Elle est soumise d'une part à une répression multivalente des trois acides aminés terminaux de la chaîne : leucine, valine, isoleucine; d'autre part à une rétroinhibition de la valine ($K_i = 3.10^{-5}$) (36).

Le site d'inhibition est très fragile, et peut être endommagé lors de la solubilisation de l'enzyme. L'inhibition est très dépendante du pH et est pratiquement nulle au-dessous de pH 6,4.

D) PÉNÉTRATION DE LA VALINE DANS LA CELLULE

1) Systèmes perméasiques

Surdin et Coll. (37) et Gremson et coll. (38,39,40) ont montré la multiplicité des systèmes perméasiques existant chez la levure.

Gremson (41) a mis en évidence l'existence de deux systèmes perméasiques différents :

- un système général de perméation permettant la pénétration des acides aminés neutres et basiques. Ce système perméasique général à faible affinité pour les acides aminés, est inhibé par les ions ammonium.

- un système plus spécifique d'un acide aminé donné ou d'un groupe d'acides aminés : il existerait un système perméasique spécifique des quatre acides aminés méthylés : méthionine, valine, leucine, isoleucine (42).

2) Pénétration et utilisation séquentielle des acides aminés dans la levure au cours de la fermentation

Jones et coll. (43) ont montré l'existence de quatre

III - OBJET DU TRAVAIL

Si les dernières études indiquent une implication probable de l' α AL dans la formation du diacétyle, on peut toutefois se demander s'il s'agit là du seul mécanisme possible ?

En vue de répondre à cette question, la première partie de ce travail a été consacrée :

- 1) à l'étude de la stabilité des cétohydroxyacides en fonction du rH, pH, t°.
- 2) à la production de mutants auxotrophes V⁻ I⁻ et I⁻
- 3) à la caractérisation physiologique des mutants obtenus
- 4) aux possibilités de formation de dicétones volatiles par les mutants.

Le contrôle de la formation des dicétones volatiles dans le cadre de la régulation de la biosynthèse de la valine et de l'isoleucine et le problème de la réduction des dicétones volatiles a constitué la dernière partie de ce travail.

A cet effet, les points suivants ont été pris en considération :

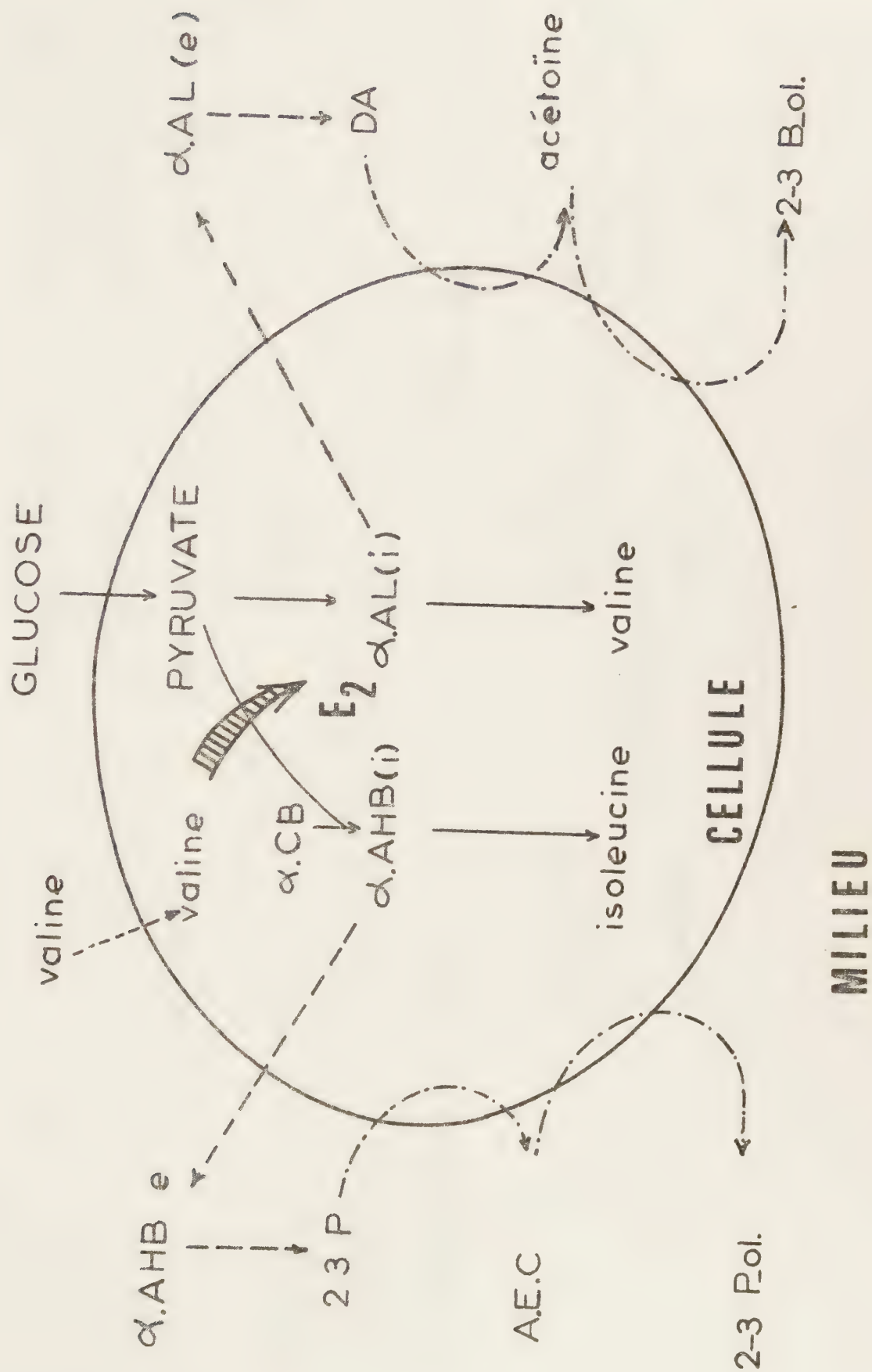
- 1) Vérification de l'effet régulateur de la valine sur la production de dicétones volatiles au cours de la fermentation
- 2) Pénétration de la valine dans la cellule
- 3) La valine comme effecteur allostérique de la synthétase
- 4) Réduction du diacétyle

Nous avons porté sur le schéma n° 4 l'ensemble des voies de formation et de régulation intervenant dans la genèse des dicétones volatiles. Ce schéma indique les voies que nous nous proposons d'étudier dans la présente étude.

La Fig. n° 5 indique les voies de formation d'alcools supérieurs à partir du métabolisme de la valine, de l'isoleuuine et de la leucine. Le matériel constitué par les mutants auxotrophes pour la valine et l'isoleucine, la leuuine, et l'isoleucine permettra ultérieurement une étude des possibilités de contrôle de la formation des alcools supérieurs et des aldéhydes correspondants. Ces constituants jouent un rôle important dans la constitution de l'arôme de la bière.

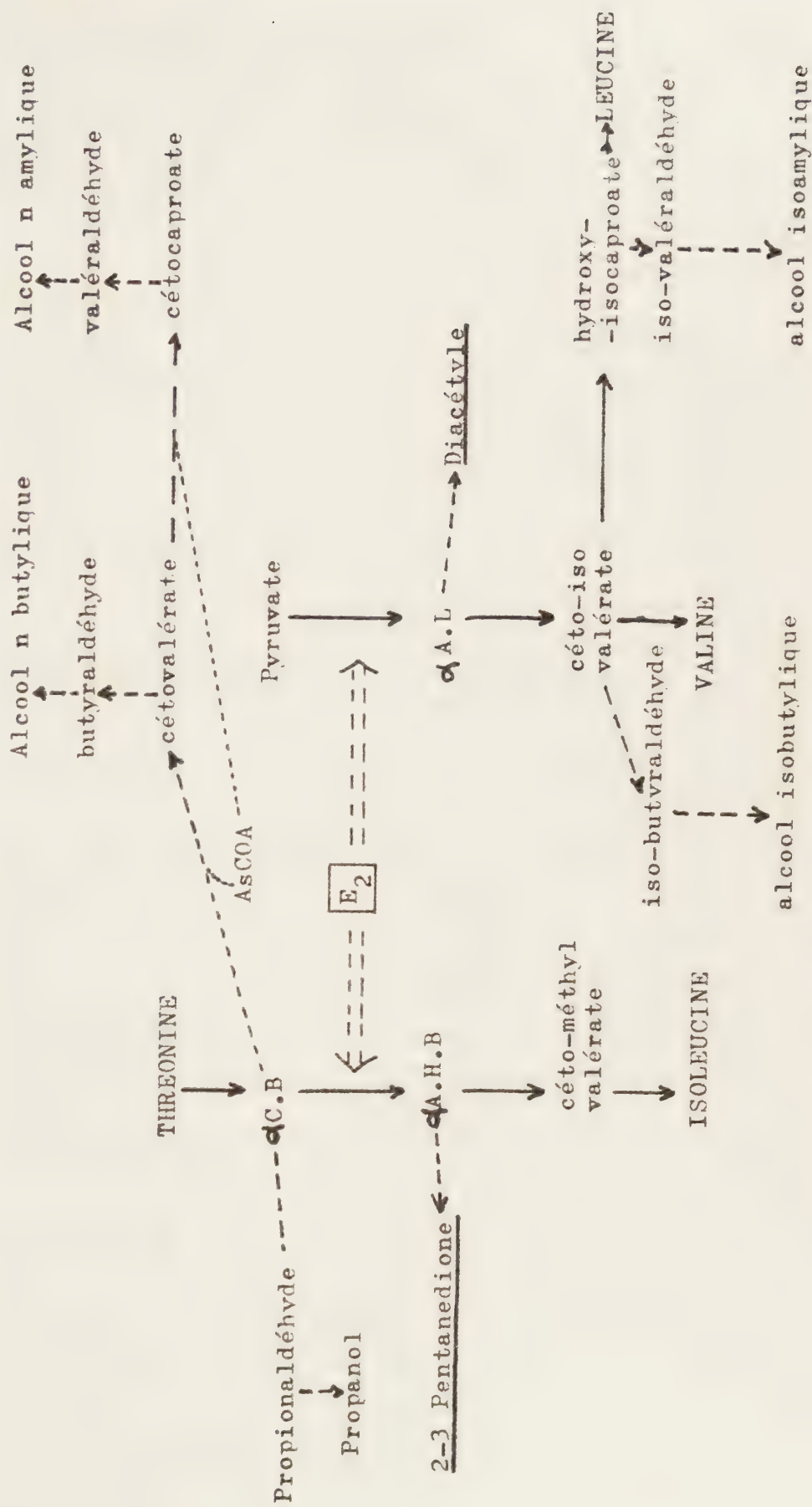
-:-:-:-:-:-:-:-

Fig:4



SCHEMA DE FORMATION DE PRODUITS SECONDAIRES PARTICIPANT A L'AROME, A PARTIR DES CHAINES METABOLIQUES DE LA VALINE, DE L'ISOLEUCINE ET DE LA LEUCINE.

Fig:5



1) Milieu de cultures utilisées

Milieu n° 1 Milieu de fermentation (préparé d'après la composition du milieu

n° 149 de l'Institut de Recherches du C.E.R.I.A.

Pour 1 litre d'eau distillée

glucose	100 g
$MgSO_4, 7H_2O$	0,7 g
$CaCl_2$	0,4 g
NaCl	0,5 g
$(NH_4)_2SO_4$	5 g
acide citrique	10 g
traces minérales	1 ml de solution n° 61
vitamines	10 ml de solution n° 60

On porte au pH désiré à l'aide de KOH 10N

Solution n° 61

Pour 1 litre d'eau distillée

acide borique	10 mg
$CuSO_4, 5H_2O$	1 mg
KI	2 mg
$FeCl_3, 6H_2O$	5 g
$MnSO_4, H_2O$	400 mg
Molybdate de Na	4 mg
$ZnSO_4, 7H_2O$	14 mg
Acide citrique	10 g

Solution n° 60

Pour 1 litre d'eau distillée

1°) panthoténate de Ca	200 mg
biotine	250 mg
acide nicotinique	100 mg
thiamine	100 mg

inositol	500 mg
acide para- -aminobenzoïque	50 mg
pyridoxine	100 mg

2°) acide Solique	500/g
NaOH III	1 goutte

Stérilisation par filtration, sur filtre Millipore 0,22 μ .
Après stérilisation, on ajoute 1 ml de solution 2° à 100 ml de solution 1°. Les solutions sont conservées à 4°C et à l'abri de la lumière.

Milieu n° 2 : Etude de croissance

Milieu de base : Yeast Carbon Base (Difco). C'est le milieu de base de Wickerham.

Stérilisation par filtration (filtre 0,22 μ)

Source d'azote : $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ 132 mg/l (2 milliéquivalents d'azote)

ou

valine	2 méq/
isoleucine	2 méq/
leucine	2 méq/
valine + isoleucine	(1 méq/ + 1 méq/)

Milieu n° 3 : Y.E.C. pH 6,5

Pour 1 litre d'eau distillée

glucose	30 g	Stérilisation à 120°C 20 mn
$\text{SO}_4 \text{Mg}$	0,5 g	
CaCl_2	0,5 g	
$\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$	2,6 g	
Yeast extract Difco	3 g	
KH_2PO_4	1,87 g	
K_2HPO_4	1,10 g	



Milieu n° 4 : YEPG : Précultures ; conservation des souches

glucose	2 %	Stérilisation à 110°
Yeast extract Difco	1 %	deux fois une 1/2 h
(L.D Hérisson) Tripticase	2 %	séparées par 24 h
		d'intervalle

Milieu n° 5 :

C'est le milieu n° 4 où la source carbonée est constituée par le glycérol au lieu du glucose.

Milieu n° 6 : sporulation (Powell) (Réf. 62)

Par litre

KCl	10 g	gélifié à 2 %
acétate de Na	5 g	

Tous les milieux cités ci-dessus peuvent être gélifiés à 2 %.

Solutions tampon :

Tampon protecteur (36)	0,1 M	pH 7,2	phosphate de K
	25 %		glycérol
	EDTA		1mM

La composition des autres solutions tampon utilisées sera indiquée au cours du travail.

Souches de levure employées :

S. Carlsbergensis 245

S. Cerevisiae sauvage 157 (2n)

S. Cerevisiae sauvage 328 (n) a : ségrégant de la souche 157 (2n)

Ces trois souches appartiennent à la collection de Monsieur MASSCHELEIN (C.B.R.I.A.)

S. Cerevisiae sauvage 1278 b (n)

Souches mutantes I⁻V⁻ : M G 23

M G 1046

M G 583

Ces souches appartiennent à la collection de Madame GRIMSON (C.B.R.I.A.)

S.Cerevisiae sauvage 264 2 b : collection de Monsieur LUYATTE (C.N.R.S. Gif-sur-Yvette). Cette souche est étudiée par Messieurs BOURGEOIS et THOUVENOT (école de Brasserie Nancy).
Souches mutantes I⁻V⁻ 461 : cette souche a été isolée par D. THOUVENOT (49) à partir de la souche 264 2 b.

2) Etudes de croissance

a) Préparation de l'inoculum

La préculture prélevée en phase exponentielle de croissance est filtrée sur filtre Millipore ($0,45 \mu$) puis lavée une fois avec de l'eau physiologique stérile. On remet en suspension dans un minimum d'eau physiologique. On effectue ensuite l'ensemencement des fioles de culture de manière à avoir une suspension de 30-60 μ g/ml de poids sec de levures.

b) Croissances proprement dites

Dalles sont effectuées dans des fioles de Wime et Storck (61) avec 20 ml de milieu n° 2. La culture est agitée sur un plateau oscillant (50 oscillations/min) dans une chambre thermostatée à 28°C.

c) Contrôle de croissance

La croissance est suivie par la variation de turbidimétrie dans un Beckman C équipé d'un filtre rouge (660 nm). La densité optique lue est convertie en poids sec ou en nombre de cellules par ml à l'aide de courbes d'étalonnage.

3) Eléments de comparaison entre des cellules diploïdes et des cellules haploïdes ségrégantes

En vue de comparer les équipements enzymatiques de cellules diploïdes et de cellules haploïdes qui en étaient issues nous avons établi une courbe étalon : densité optique/ nombre de cellules en suspension.

D'autre part nous avons cherché à mettre en évidence sur les souches que nous étudions les observations faites par Hilger (65).

Enfin nous avons cherché à mettre en évidence la relation existant entre degré de ploïdie et volume cellulaire (Windish 66) pour les souches que nous utilisons.

Les comptages ont été effectués à l'hématimètre.

Résultats :

Nous avons pu différencier cellules diploïdes de cellules haploïdes par la nature des figures de bourgeonnement et la présence ou non d'agréats cellulaires. (Voir tableau ci-dessous).

Mensurations : Les bourgeons sont exclus de l'échantillonnage. On mesure pour chaque cellule les axes $a \times b$; la cellule est considérée comme une ellipsoïde de révolution. Le volume de l'ellipsoïde est calculé comme suit : $v = \frac{4}{3} \pi \left(\frac{a}{2} \right) \left(\frac{b}{2} \right)^2$

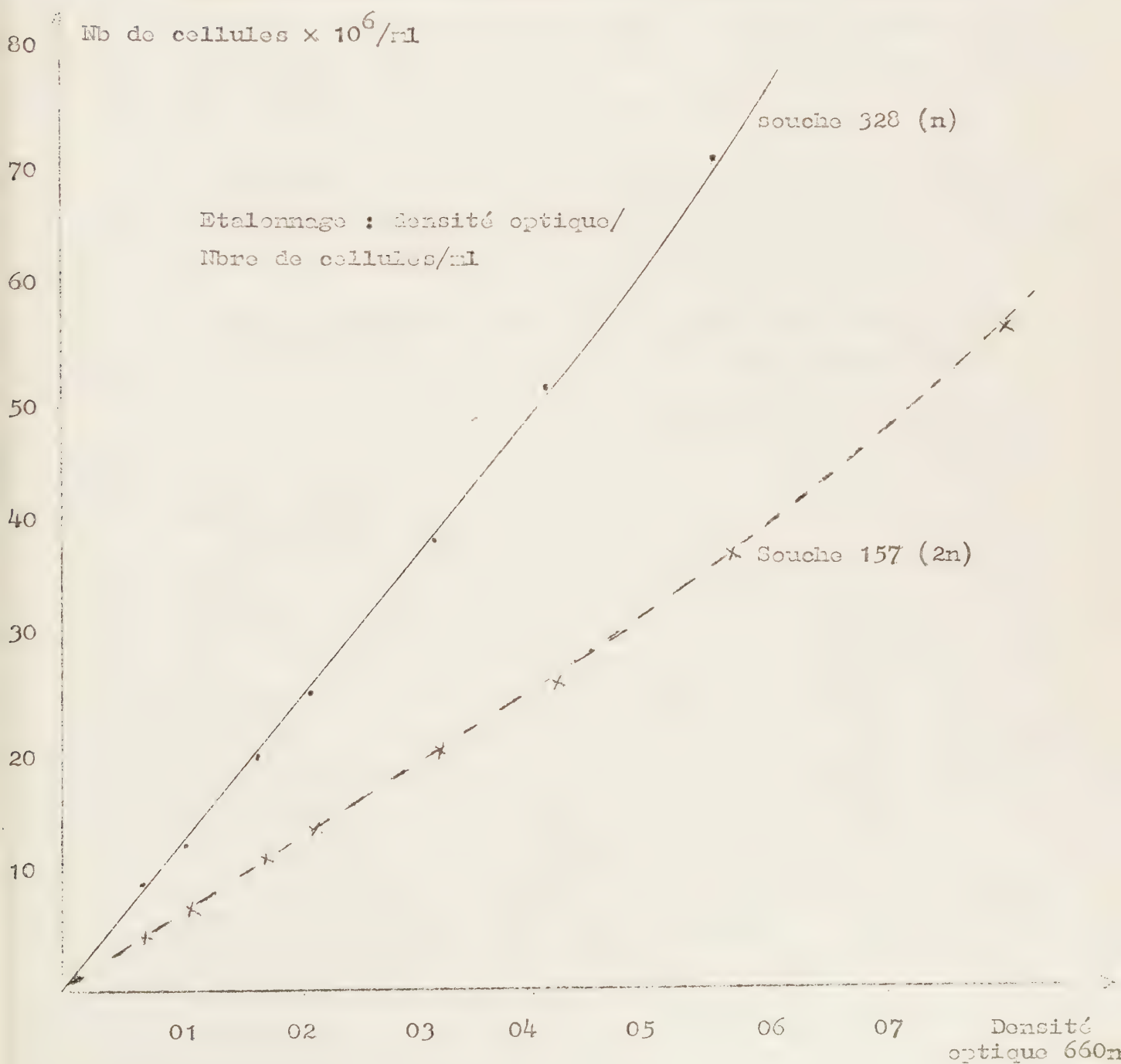
Mensurations : $a \times b$ en divisions du micromètre oculaire	Souche 157 (2n)	Souche 328 (n)
	6,5 x 5,7	5 x 4,6
Figures de bourgeonnement	Aucun "corps en rosette"	Nombreux "corps en rosette"

La moyenne des mensurations a été établie sur 50 cellules.

Le rapport des volumes cellulaires calculé d'après le tableau précédent était de

$$\frac{v(2n)}{v(n)} = 1,98$$

Ces résultats sont en accord avec l'étalonnage Densité optique/nombre de cellules (voir figure page suivante).



4) Analyses

- pH : au pHmètre Beckman sur du milieu centrifugé ou filtré.
- Léthalité : - par inclusion dans la gélose surfondue à 45°C de la suspension cellulaire de densité optique connue
- par coloration au bleu de méthylène (0,01 %)
- Concentration en sucre du milieu fermentaire :
 - . Méthode à l'anthrone (exposée précédemment) (50)
 - . Méthode densimétrique : mesure de la vitesse de chute d'une goutte dans un mélange de densité donnée. Méthode de Clendinning modifiée par Bantsik (46).

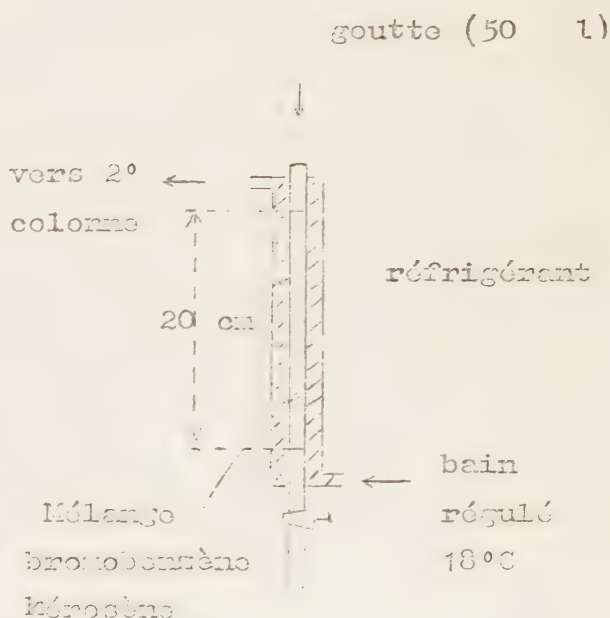
Principe : On mesure la vitesse de chute d'une goutte de volume constant (50 μ l) dans un mélange non miscible à l'eau et de densité donnée à une température constante.

Mode opératoire : Nous avons adapté cette méthode à nos besoins et avons suivi le mode opératoire suivant :

Schéma de la colonne utilisée

Courbe d'étalonnage :

Nous avons utilisé deux colonnes avec deux mélanges de densités différentes pour couvrir un intervalle de densité allant de 1° à 13° Plato. Les colonnes sont remplies de mélange : bromo-benzène+kérosène dans des proportions telles qu'une goutte de densité 3° Plato mette 26,5 secondes pour parcourir 20 cm dans la 1° colonne et 8 secondes dans la 2° colonne.

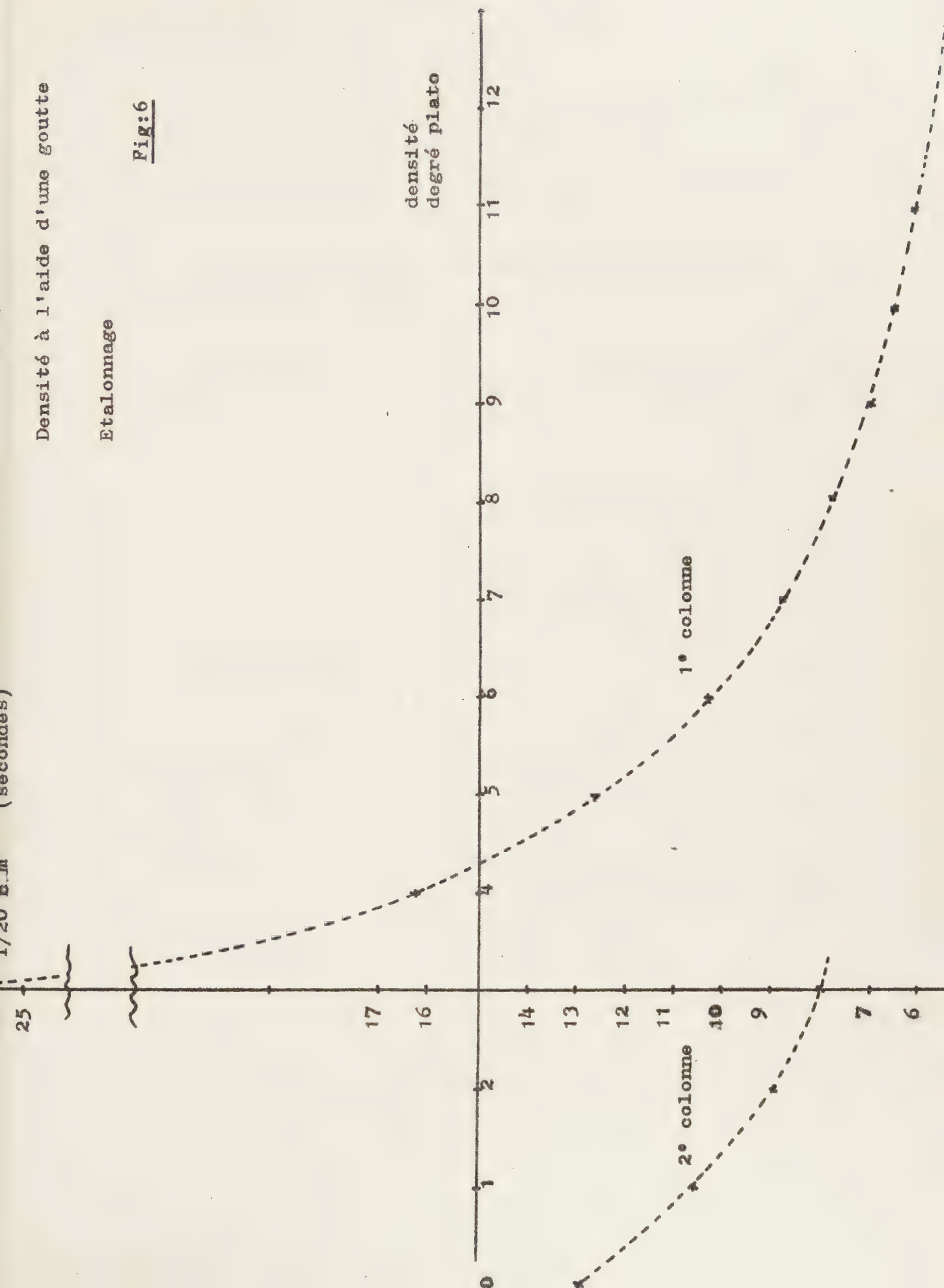


1/20 E.M (secondes)

Densité à l'aide d'une goutte

Etalonnage

Fig:6



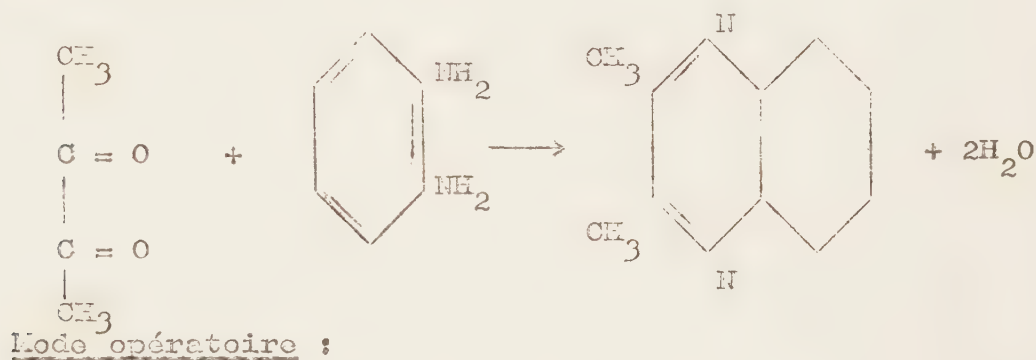
Les densités étalons de 1° à 13° plato étaient réalisées à partir de solutions de CuSO_4 (46).

La vitesse d'une goutte de milieu centrifugé est convertie en densité à l'aide des courbes étalons (Fig. n° 6).

- Dosage colorimétrique des dicétones volatiles :

1) Méthode de Gjersten (53)

Principe : La réaction de l'ortophénylènediamine (O.P.D.) avec les dicétones, donne un complexe coloré présentant un maximum d'absorption à 335nm.



blanc	Essai
10 ml éthanol 10 %	10 ml de distillat de milieu fermentaire
+ 0,5 ml d'O.P.D.	+ 0,5 ml d'O.P.D. (1 % dans eau distillée solution fraîchement préparée)
25 mn de réaction à l'obscurité.	
+ 2 ml HCl 4N	+ 2 ml HCl 4N

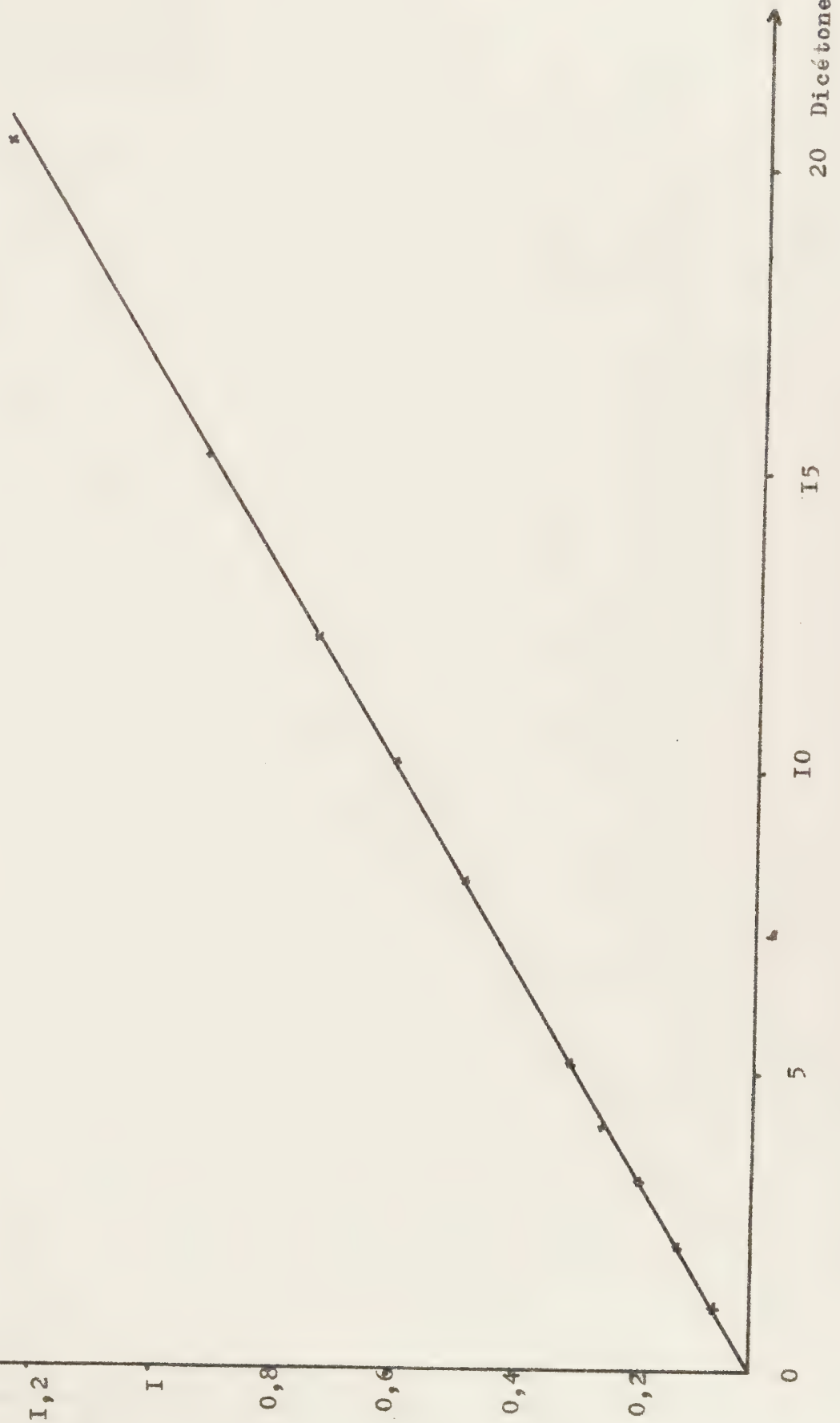
On effectue la lecture à 335nm dans les 15 minutes. Une courbe d'étalonnage pour les dicétones (Diacétyl et 2-3P) (Fig.n° 7) est établie.

Fig:7

DOSAGE DES DICÉTONES VOLATILES (Diacétyl et 2-3 Pentanedione)

D.O

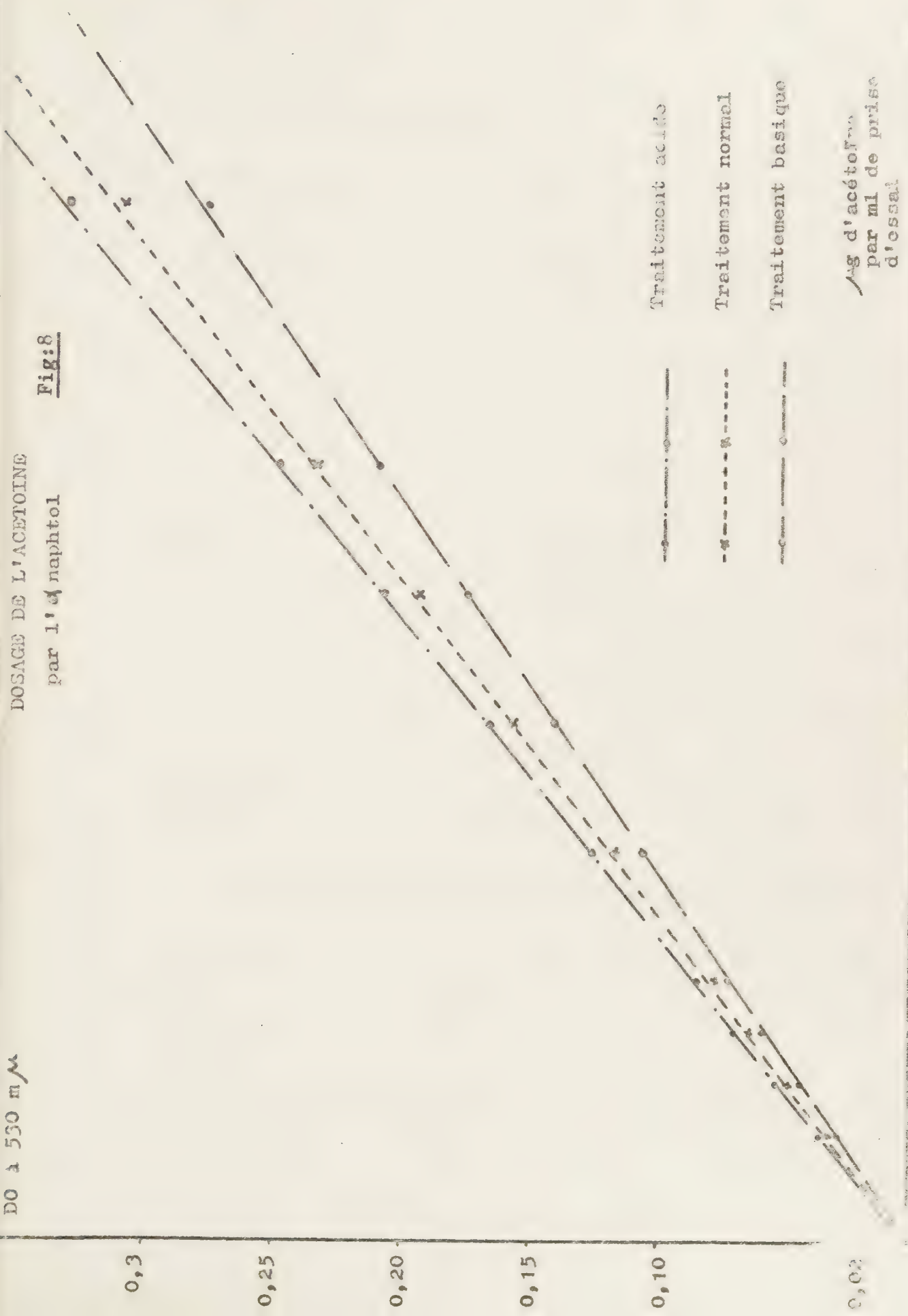
à 335 m μ



DO à 530 m μ

DOSAGE DE L'ACÉTOINE
par 1' α naphтол

Fig:8



Traitement acide
Traitement normal
Traitement basique
Ag d'acétone
par ml de prise
d'essai

2) Méthode à 1' D. naphтол

Cette méthode permet en outre le dosage de l'acétoïne et de l'acétyléthylcarbinol.

Principe : Le dosage est basé sur la réaction des dicétones de l'acétoïne, de l'acétyléthylcarbinol avec un groupement guanidine en milieu alcalin.

Mode opératoire :

essai	blanc
5 ml de solution à doser	5 ml d'eau distillée
+ 1 ml de créatine (0,5 % dans KOH 40 %)	
+ 1 ml d' naphтол (4 % dans NaOH 2,5 N)	
- Agitation énergique (mixer)	
- 5 minutes à 55°C	
- Agitation énergique (mixer)	

On effectue la lecture à 530mμ . Une courbe étalon est établie pour des solutions neutres, basiques, et acides (Fig. n°8).

- Chromatographie des 2-4 D.N.P. sur couches minces :

Principe : Les composés aldéhydiques et cétoniques réagissent avec la 2-4 D.N.P. pour donner des hydrazones séparables par chromatographie sur couches minces.

Mode opératoire : Formation des hydrazones.

10 ml de milieu centrifugé + 40 ml de 2-4 D.N.P. (0,3 % dans
HCl 2N)

Réaction : 1 heure à 30°C

↓
Précipité d'hydrazones

Filtration.

lavage à l'eau distillée

lavage à l'éthanol à 60°C

(élimination de la 2-4 DNP
au pyruvate).

Dissolution dans un mélange
éther, pyridine (2.1)V/V

↓
Hydrazones dissoutes

Chromatographie :

Matériel : - couches minces de silicagel HF 254 activées
1 heure à 105°C

- Eluant : benzène-acide acétique (9/1. V/V).

Toutes les séparations sont conduites en présence de
témoins à des fins d'identification.

Chromatographie en phase gazeuse.

La chromatographie en phase gazeuse nous est apparue comme
une technique de choix pour la séparation et l'identification
des α dicétones. Nous avons été amené à cette fin à faire
des essais avec deux types de détecteur :

- le détecteur à ionisation de flamme qui nous
permettait de distinguer l'acétoïne des dicétones.

- le détecteur à capture d'électrons nous permettait
de différencier les α dicétones, en particulier le diacétylo
et la 2-3 pentadione.

L'intérêt de ce 2° type de détecteur a été montré par Harrisson (12). Suomalainen (7) a utilisé cette technique pour suivre la décomposition de 1'Q acétylsalicylate. Cette méthode nous permettait d'éviter les artefacts de dosage dus à une distillation préalable du milieu fermentaire.

Détecteur à capture d'électrons :

Principe : Une source d'électrons (Tritium) bombarde le gaz vecteur inerte (argon-méthane) ; il n'y a alors qu'une très faible ionisation dans la cellule de détection. Si l'on introduit dans la colonne une substance électrophile, il y aura formation d'ions négatifs. La chute de potentiel résultant de cette ionisation est amplifiée et enregistrée. La réponse de ce détecteur est proportionnelle à la concentration en soluté.

Sensibilité : Vis-à-vis des groupements fonctionnels tels que ; quinones, dicétones, esters de l'acide fumarique, composés de la forme $R - CO - CH = CH - CO - R$

Matériel employé :

colonnes : TOBP 20 % sur cétilé ; L = 2 m ;

Carbowax 1500 ; L = 2 m

appareil : Hewlett Packard Modèle 720

Les conditions d'emploi sont indiquées dans la partie "Résultats" du travail.

5) Dosages enzymatiques :

a) Extrait enzymatique (36)

Les cellules sont lavées dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,2 puis remises en suspension dans le tampon protecteur pH 7,2.

La turbidimétrie est ajustée à environ 50 mg/ml en poids sec de levure. On place 10 ml de cette suspension dans la cellule de broyage où l'on rajoute 20 g de billes de verre de 0,45-0,50 mm de diamètre. La cellule est placée dans un broyeur MSK Braun refroidi à la neige carbonique. On soumet la suspension à deux broyages successifs de 1 minute à 4000t/min.

On centrifuge ensuite la préparation à 25000 g durant 15 minutes dans une centrifugeuse Spinco refroidie à 0°C.

b) Perméabilisation des cellules

Nous avons employé la méthode de De Robichon-Szulmajster et Mageo (36) (57) modifiée pour nos besoins.

Les cellules sont lavées dans un tampon phosphate 0,1 M pH 7,2 puis remises en suspension dans le tampon protecteur : la turbidimétrie est ajustée entre 800 à 1200 mg/ml en poids sec de levures.

On ajoute 10 % de benzène à la suspension (30 ml) et on effectue une agitation violente ("mixer") durant 30 secondes ; la suspension est placée à 30°C pendant 90 secondes. Le benzène surnageant est éliminé par centrifugation à 15000 g durant 5 minutes dans une centrifugeuse refroidie. Le culot est remis en suspension dans le tampon protecteur : les cellules perméabilisées sont alors utilisées pour le dosage enzymatique.

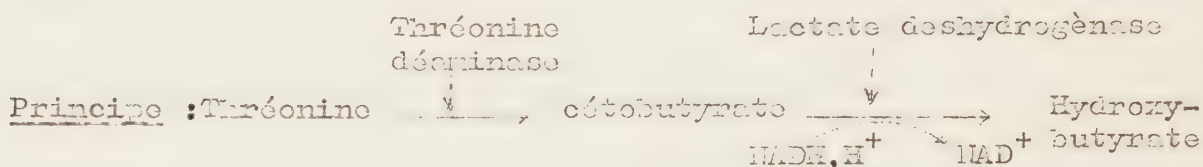
c) Dosage des protéines

Sur les extraits bruts : il est effectué par la méthode au biuret. Des courbes étalons ont été établies par Bourgeois et Thouvenot (54) pour tenir compte de la présence de glycérol dans l'extrait brut.

Sur les perméabilisats : La suspension cellulaire est diluée 10 fois dans NaOH 1 M portée à ébullition 5 mn et centrifugée. L'essai est fait ensuite avec le biuret (57)

d) Dosage de la thréonine déaminase

Ce dosage est basé sur la réaction couplée décrite par Holzer (60)



On mesure la disparition du NADH par la diminution d'absorption à 340nm en fonction du temps.

Méthode : Dans chaque cuve de quartz on place les quantités suivantes de réactifs : la réaction est démarrée par addition de l'extrait brut.

	essai	blanc	témoin
Tampon Tris 1 M pH 8 : μ 1	600	600	600
Lactate deshydrogénase fluka : ml	30	30	30
NADH γ (10 mg/l) : μ l	30	30	30
Thréonine (0,5M)	150	150	0
Extrait brut	quantités 20-60	variables 0	de 20-60
Eau distillée QS	3 ml	3 ml	3 ml

Les mesures sont prises après les deux premières minutes de réaction au spectrophotomètre Beckman DU à 340nm.

Les activités spécifiques sont exprimées comme : $10^3 \times \text{absorption à } 340\text{nm}$.

Une activité spécifique de 1 correspond à 16 nmoles de substrat transformé /mm/mg de protéine.

Le témoin permet de tenir compte de l'activité des NADH⁺ oxydases de l'extrait brut. Dans ce type d'extrait l'activité NADH⁺ oxydasique reste très faible (voir résultats).

c) Dosage de l'acétohydroxyacide-synthétase

Nous avons employé avec quelques modifications la méthode de De Wittichon-Szulmajster (36). Le temps de réaction et la quantité ont été choisis en fonction des essais préliminaires (Fig. n° 9) réalisés en respectant les concentrations en substrat indiquées ci-dessous (voir Figure p°9)

*extrait

Principe : On dose l'acétoïne provenant de la décarboxylation de l' γ acétolactate formé au cours de la réaction enzymatique.

Méthode opératoire :

	Essai	blanc
pyruvate μ moles	50	0
MgSO ₄ μ moles	2	2
T.P.P. μ g	20	20
Tampon pH 7,2	q.s 3,5 ml	q.s 3,5 ml
cellules perméabilisées	1 ml	1 ml

Les essais sont faits dans des tubes type hémolyse.

Le tampon est constitué de KH_2PO_4 0,2 M ajusté à pH voulu avec du Tris IM.

Les tubes sont équilibrés 5 min à 30°C ; on rajoute 1 ml de cellules perméabilisées (suspension cellulaire de 800 à 1000 $\mu\text{g/ml}$), au temps 0.

Fig:9

$\mu\text{g d'Acet/ml}$
-oine

Formation d'A.L en fonction de la
quantité de perméabilisant cellulaire
mise en réaction.

I

Perméabilisant: 888 $\mu\text{g/ml}$

Temps de réaction: 30mn

0,5

volume de
perméabilisant

0,4 0,6 0,8 1 1,2 1,4 ml

$\mu\text{g d'Acet/ml}$
-oine

Formation d'A.L en fonction du
temps de réaction.

1,2

1

0,8

Perméabilisant: 888 $\mu\text{g/ml}$

Volume de perméabilisant

mis en réaction: 1 ml

0

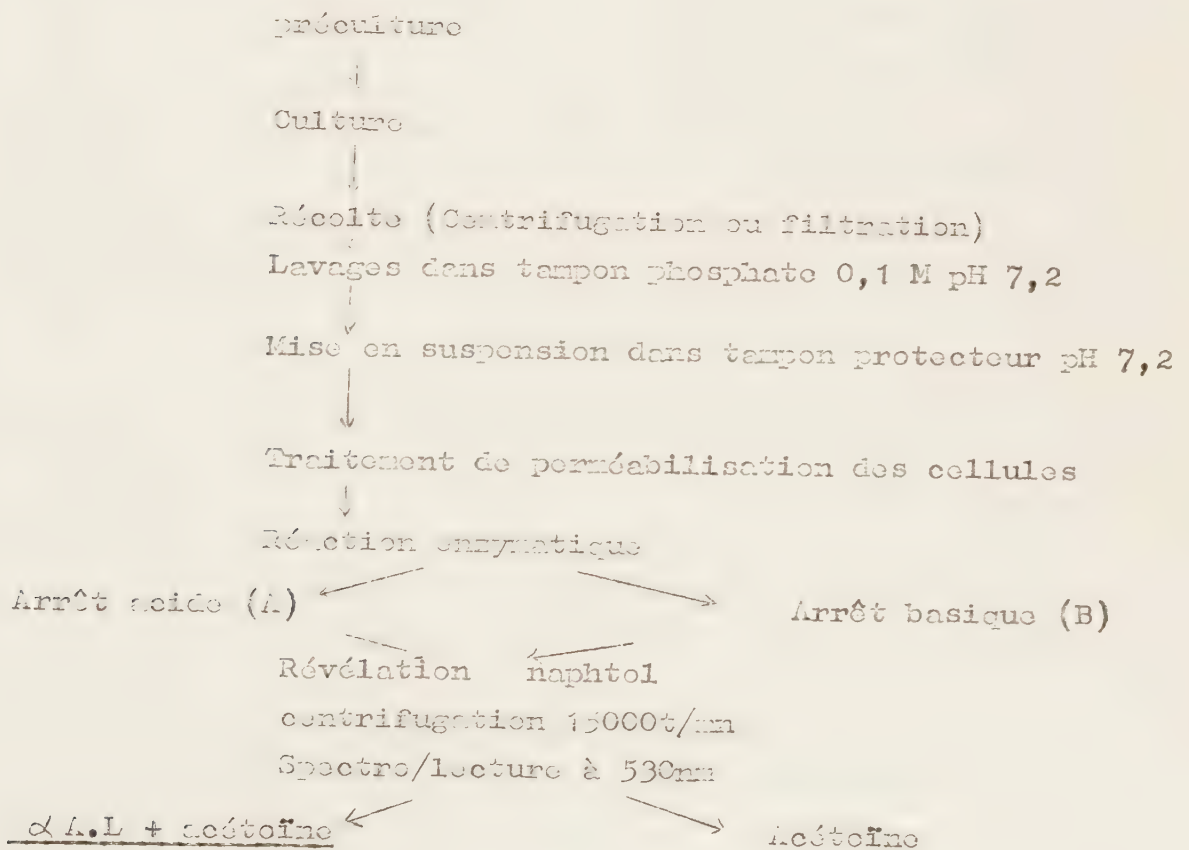
10 15 20 25 30 Temps:mn

Après 30 mn la réaction enzymatique est arrêtée par l'addition de :

(0,5 ml de 6N H_2SO_4 ----- (A)
ou (
(0,5 ml de 2,5N NaOH ----- (B)

Les tubes (A) sont portés à 55°C durant quinze minutes, afin de permettre la décarboxylation complète de l' α AL formé, en acétoïne. On dose alors l'acétoïne par la méthode à l' α naphтол (p.27). On établit une courbe étalon correspondant à chaque traitement acide (A) et basique (B) (Fig. n° 8). Chaque essai est fait en double.

Schéma de principe de manipulation pour le dosage de l' α acéto-
hydromycoïde-synthétase



Activité synthétasique : $DO (A) - DO (B)$
530nm 530nm

Remarque : Le système de formation de l'acétoïne fonctionne encore à pH 7,2 ; le dosage effectué permet de distinguer les deux systèmes enzymatiques.

On calcule par différence A-B l'activité de la synthétase. Cette activité est exprimée en : n moles d' α A.L formées/mg de poids sec/30 m de réaction.

6) Incorporation de valine C_{14} dans la cellule

Matériel : C_{14} valine

Activité totale : 0,05 mCi en solution dans HCl
0,01 N (0,5 ml)

Activité spécifique : 108 mCi/nMoles

Mode opératoire : La suspension cellulaire prélevée en phase de croissance exponentielle sur milieu n° 2 ($SO_4(NH_4)_2$) est lavée à l'eau physiologique puis remise en suspension dans la base de Wickerham sans source d'azote. On laisse incuber durant 5 mn à 30°C la suspension en présence d'actidione (1mg/l).

On introduit 9 ml de cette suspension (ajustée à 245 mg/l en poids sec de levures) au temps 0 dans une fiole contenant

- 0,5 ml de valine marquée (5 μ Ci)

- 0,5 ml de valine (solution de 4,2 à 0,18 mg/l)

La fiole est agitée dans un bain-marie à 30°C.

On effectue des prélèvements de 1 ml qui sont filtrés sur filtres Millipore (0,45 μ ; diamètre 25 mm) et lavés rapidement avec 50 ml d'eau physiologique glacée. Les filtres sont ensuite séchés dans des coupelles d'aluminium à 60°C environ.

Le comptage de radioactivité est fait au S.A.I.P. flow counter type SPM 3 T. La radioactivité incorporée dans la cellule est exprimée en pourcentage de la radioactivité totale de la suspension sur milieu.

C) PRODUCTION DE MUTANTS BIOCHIMIQUES

Matériel : Dans nos premières manipulations nous avons employé une souche haploïde de *Saccharomyces Cerevisiae*. Les gènes mutés "is" étant récessifs, le phénotype muté ne sera exprimé dans la souche diploïde que si les deux gènes allèles sont mutés. Cette probabilité est faible (théoriquement de $10^{-7} \times 10^{-7}$ si l'on admet que la fréquence de mutation spontanée du 2^e gène allèle est identique à celle du 1^e gène allèle).

L'emploi d'une souche haploïde augmentait nos chances de succès.

Nous n'avons pas pu utiliser dans ce travail de ségrégants haploïdes de souches polyploïdes de brasserie. L'isolement de telles souches n'a pas pu être réalisé pour l'instant (55) . En vue d'ouvrir de nouvelles perspectives dans l'obtention de souches industrielles améliorées, nous avons cherché à sélectionner à partir de souches diploïdes des mutants auxotrophes. Cette étude sera poursuivie dans notre laboratoire. (Voir chapitre : Conclusion).

Vérification du degré de ploïdie de la souche mère :

Détermination du signe

On utilise le test de sporulation sur milieu n° 6. La souche présumée haploïde est confrontée avec les 2 marqueurs de signes connus a et A

Après un temps de contact d'une nuit dans un milieu riche (YEP) les deux suspensions sont testées sur milieu de sporulation.

Méthode : Nous avons suivi le mode opératoire de Snow (48) "optimisé" par Thouvenot (49).

Chaque souche de levure présente un comportement différent vis-à-vis de l'agent mutagène et de l'antibiotique utilisé lors de la phase de sélection. Une étude préalable pour

déterminer les concentrations optimales d'agent mutagène et d'antibiotique est nécessaire (voir V 2).

Préculture : Elle est effectuée sur milieu n° 4. Les cellules sont prélevées au bout de vingt heures de culture (durant la phase stationnaire de croissance). Après lavage à l'eau physiologique stérile, les cellules sont remises en suspension dans un tampon Tris HCl pH 7,4 à la turbidimétrie de 10^7 cellules/ml.

Traitement mutagène : Nous avons employé l'éthylméthane-sulfonate comme agent mutagène. Ce composé agit en modifiant l'appariement des bases azotées. Le couple Adénine-Thymine est remplacé par le couple Guanine-Cytosine lors de la répllication de l'ADN. Le pH optimum d'action de l'E.M.S. est de 7,4. Pour les souches mères utilisées, nous avons étudié au préalable les concentrations d'E.M.S. nécessaires pour avoir une mortalité d'environ 50 % dans une population de 10^7 cellules/ml traitée durant 3 h avec l'agent mutagène. (Fig. 20) La suspension cellulaire est agitée 3 h à 28°C.

Lavages : La mutagénèse est arrêtée par filtration de la suspension cellulaire ; cette dernière est lavée à l'eau physiologique ; on neutralise les traces d'E.M.S. avec du S2 O3Na_2 6 % durant 10 minutes et on procède à un nouveau lavage à l'eau physiologique.

L'étude de l'action létale de l'E.M.S. est réalisée par inclusion dans du milieu gélosé n° 4 des suspensions traitées avec différentes concentrations d'E.M.S.

Phase d'expression des mutations : Les cellules sont inoculées au milieu n° 2 ayant comme seule source d'azote les acides aminés pour lesquels on recherche les mutants auxotrophes. Dans le cas présent la source d'azote est : valine, isoleucine et leucine (3 mg d'azote).

Cette phase d'enrichissement dure 10 h.

Sélection : Pour enrichir la suspension cellulaire en mutants auxotrophes désirés, on élimine le maximum de cellules prototrophes et de cellules auxotrophes non recherchées. On utilise pour cela les propriétés de certains antifongiques qui agissent sélectivement en détruisant les cellules en voie de développement. Nous avons employé la nystatine qui agit au niveau des stérols de la membrane (Laypen 1966, (64)

Dans ce but on inocule la suspension de levures traitées dans le milieu nutritif n° 2 supplémenté avec tous les acides aminés (à raison de 10 mg/l pour chaque acide aminé) excepté la valine, la leucine et l'isoleucine. Ce milieu permet le seul développement des cellules prototrophes, et des cellules auxotrophes autres que celles recherchées.

L'antifongique ajouté en phase de croissance, tout en respectant les cellules mutées, qui ne se développent pas, élimine les cellules en phase de croissance.

Nous avons recherché les concentrations de nystatine nécessaires pour obtenir une mortalité de 99,5 % de cellules prototrophes (suspension à 10^7 /ml) en croissance exponentielle pour un temps d'action de 1 h 30 (Fig.20).

pH optimum d'action de la nystatine : Le milieu nutritif minimum est tamponné à pH 4,2 (KH_2PO_4 , III).

L'action de la nystatine est arrêtée par dilution dans l'eau physiologique.

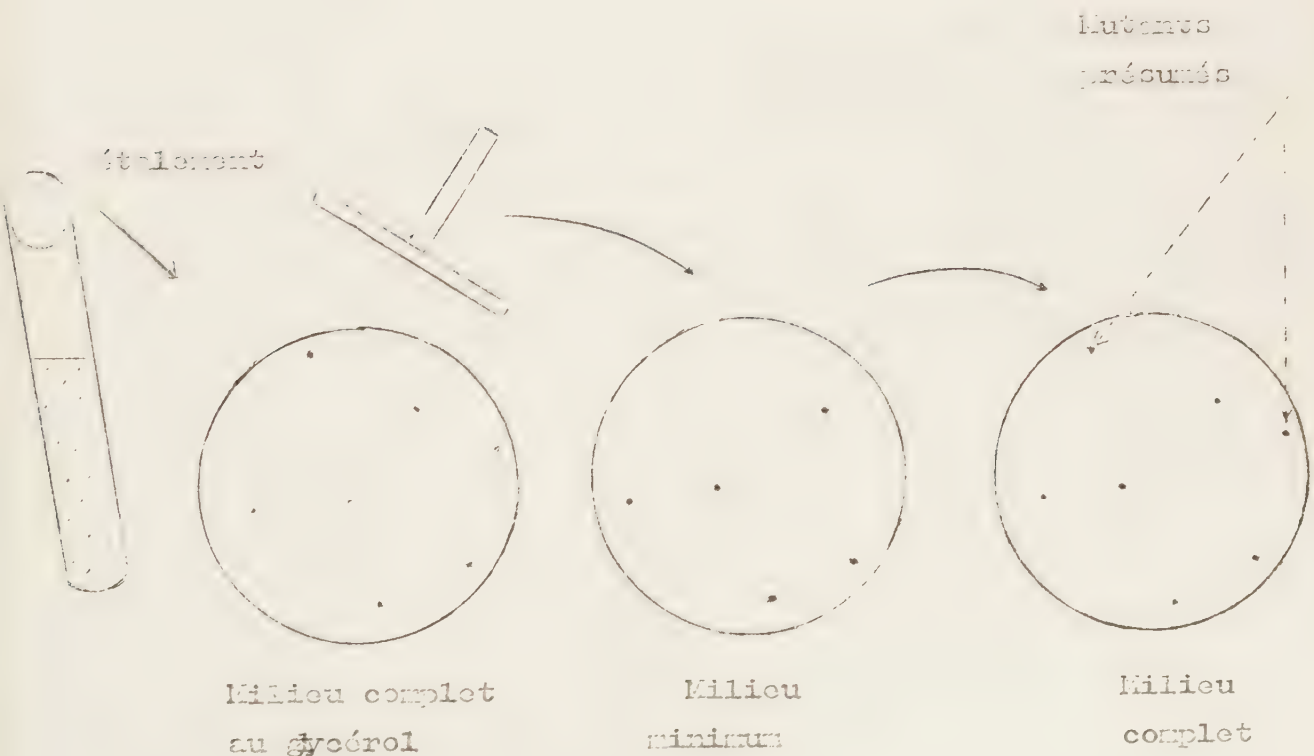
Pour améliorer la sélection, on fait précéder le traitement à la nystatine par une phase d'épuisement du pool des acides aminés de la cellule. Cette privation d'azote (sur milieu Yeast Carbon base Difco) est prolongée jusqu'à arrêt de toute croissance.

Étallement sur milieu solide : on élimine les mutants respiratoires - petites colonies par étallement sur milieu à source de carbone non fermentescible (glycérol).

Isolément des mutants auxotrophes :

Il est effectué à l'aide de la technique de réplification de Lederberg (56)

REPLICATION



Les mutants présumés sont alors testés quant à leur besoin à l'aide de cette technique, puis pour confirmation sur milieu liquide minimal et complet : l'incubation est réalisée à 28°C sur un tourne tubes ; au bout de 3 jours les tubes de milieux minimaux troubles sont éliminés. Ce test permet de confirmer l'auxotrophie des mutants isolés et d'éliminer les souches peu stables.

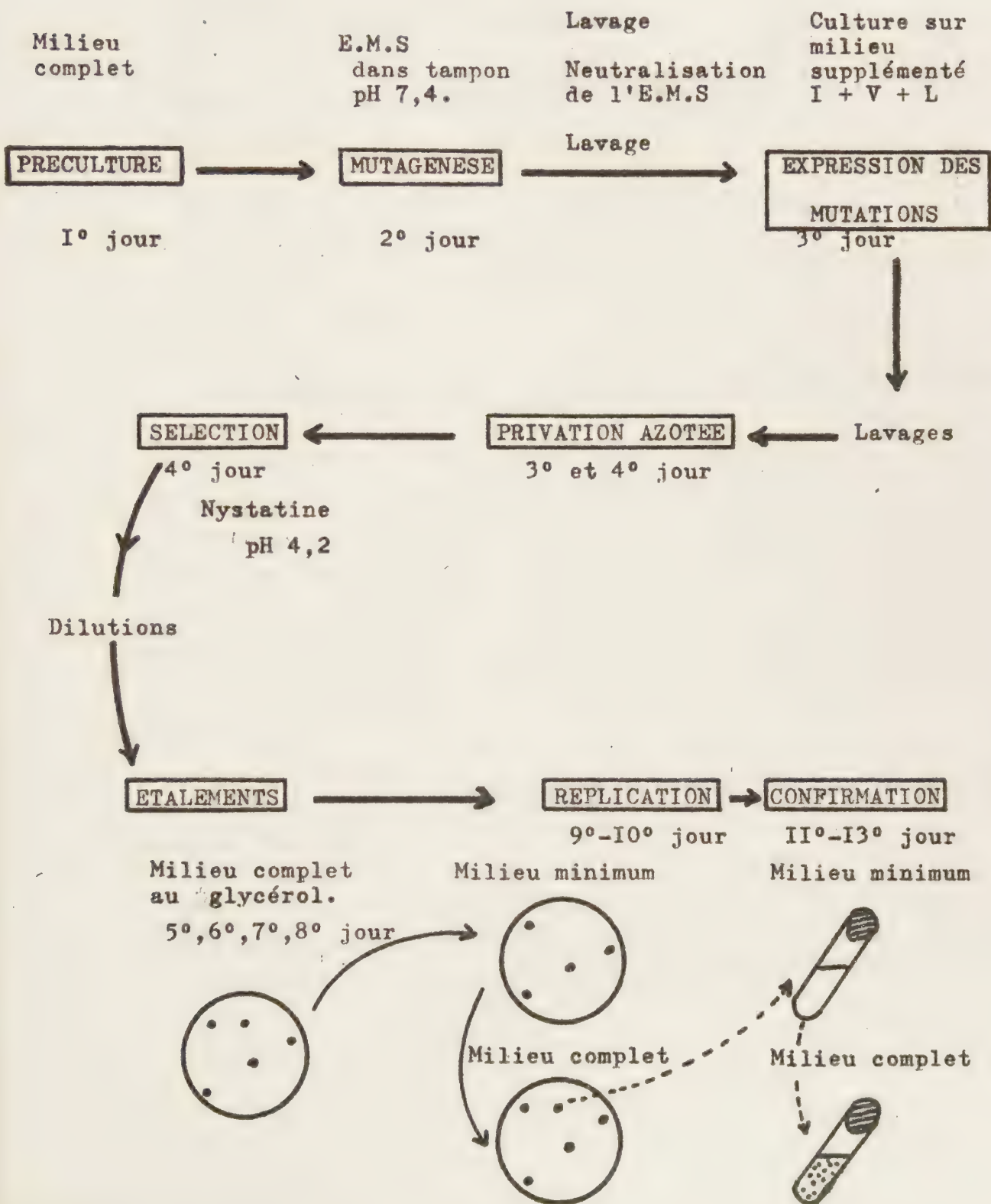
Conservation : Les souches mutantes sont repiquées sur milieu gélosé n° 4 en tube incliné et conservées à 4°C. Les souches sont repiquées tous les quatre mois.

Modification de la méthode pour l'obtention de souches mutantes diploïdes.

Nous avons réalisé deux mutagénèses successives séparées par une phase d'enrichissement sur milieu n° 4. La concentration d'D.H.C. nécessaire pour provoquer une mortalité de 60 % a été préalablement recherchée.

La 2° phase d'enrichissement suivant la 2° mutagénèse est réalisée sur milieu YCD complétée avec les acides aminés pour lesquels on recherche des souches auxotrophes.

SCHEMA DE PRINCIPE DE PRODUCTION DE MUTANTS AUXOTROPHES



V - RÉSULTATS EXPERIMENTAUX

1) ROLE CENTRAL DES CÉTOHYDROXYACIDES DANS LE MÉCANISME DE FORMATION DES DICÉTONES VOLATILES

A) Stabilité des cétohydroxyacides en fonction du pH, du rH et de la t°

Matériel : l'acide α cétolactique provient de la saponification de son acétoxyéthylester (50).

Le mélange des cétohydroxyacides provient de milieu fermentaire (voir §1 C 3).

a) Décomposition de l' α AL à différents pH en présence d'air

Les solutions provenant de la saponification de l'ester α -cétolactique sont diluées dans les tampons désirés. Le diacétyl formé est dosé directement dans le tampon suivant la méthode de Gjersten (voir Chapitre IV). L'étude de décomposition était effectuée à 20°C dans des fioles non agitées (Fig. n° 11). Nous avons étudié de même l'effet de la distillation en présence d'air sur la stabilité de solutions d' α AL (Fig. n° 12).

b) Influence du rH sur la stabilité de solutions d' α AL cétohydroxyacides

Les essais sont effectués dans un tampon acétate 1 M pH 4,5 additionné suivant les cas :

dihydrosulfite de sodium (0,4 mM/1) avec barbotage d'azote
ou

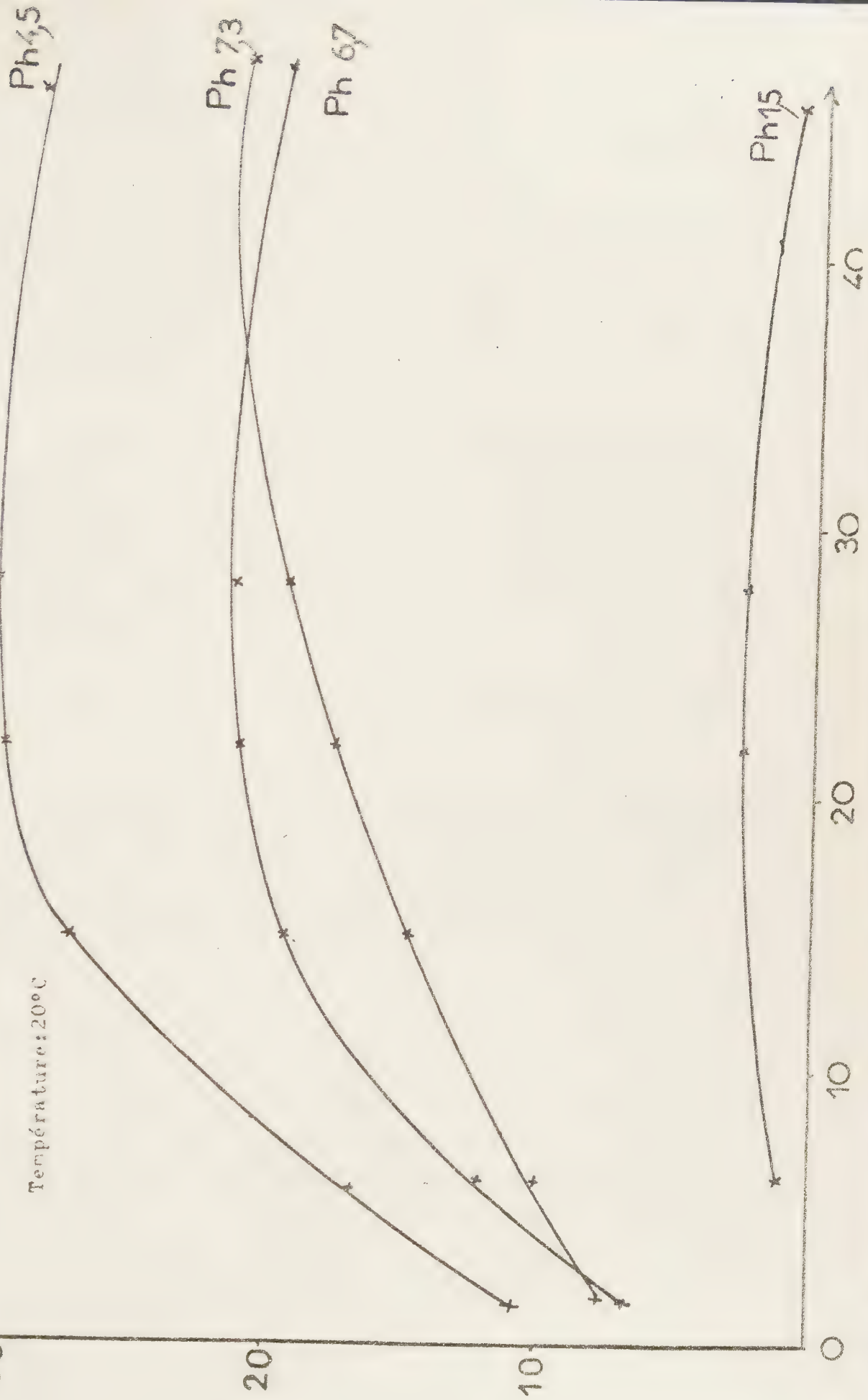
de FeCl_3 (0,4 mM/1).

% A de décomposition.

Fig:II

Décomposition de l' α AL en DA à différents ph

Température: 20°C



Au temps 0 on introduit dans 20 ml de solution de pH faible (hydrosulfite) ou élevé (FeCl_3) 20 ml de milieu fermentaire préalablement centrifugé.

La fermentation a été menée avec la souche 245 dans les conditions indiquées au § 32 ; le prélèvement était effectué après 3 heures de fermentation.

Au cours du temps la concentration en dicétones des solutions est dosée (Fig. n° 13). Avant toute analyse chaque prise d'essai est additionnée d'un excès d'EDTA pour éviter toute interférence des substances rédox (FeCl_3 et hydrosulfite) avec les réactifs du dosage colorimétrique. (8)

La concentration de dicétones dosée au temps 0 était de 0,5 ppm.

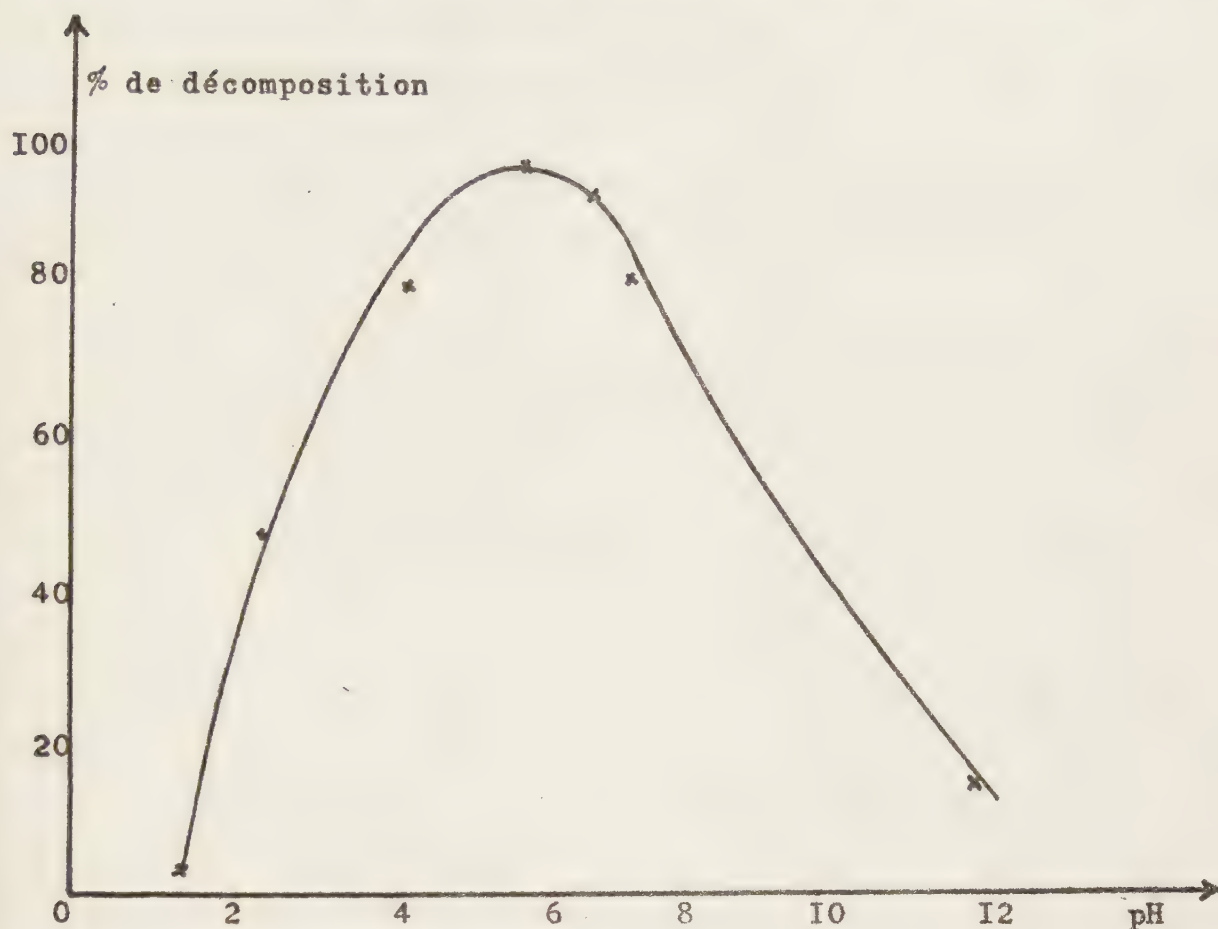
Il apparaît que la décomposition des cétohydroxyacides est très rapide et totale en présence de FeCl_3 . En milieu réducteur (hydrosulfite) on ne note que peu de décomposition supplémentaire et les cétohydroxyacides restent stables dans ces conditions (Figure n° 13).

Discussion :

Ces résultats montrent que la zone de pH voisine de 4,5 est la plus favorable à la décomposition de l' α AL.

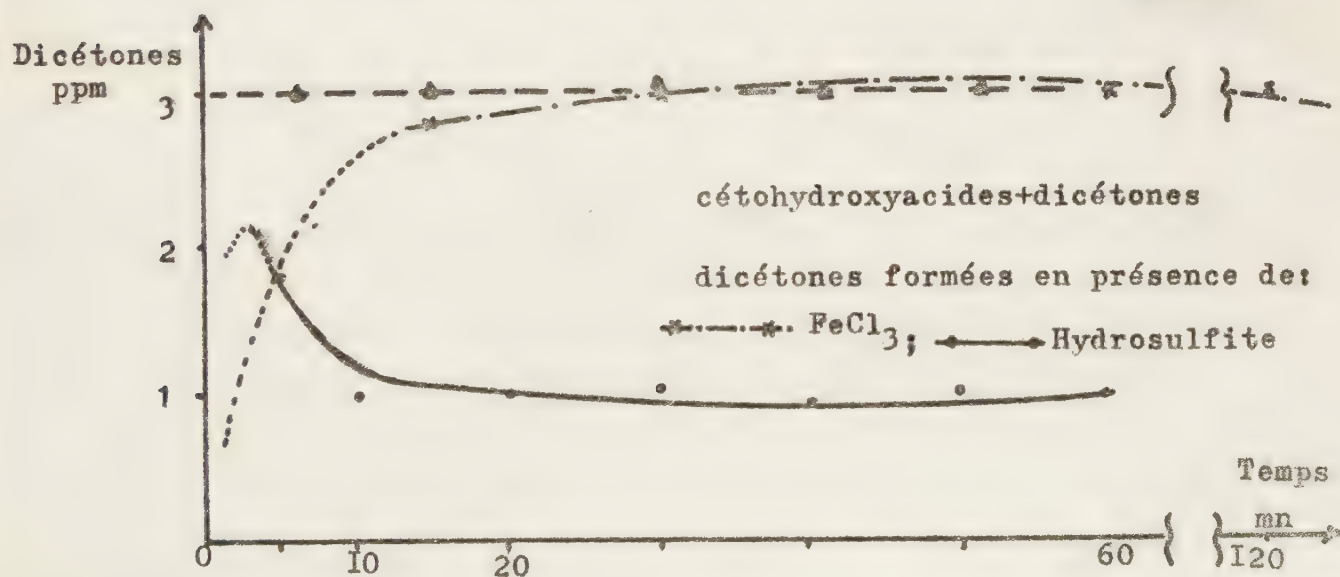
A pH faible (inférieur à 1,5) ou élevé (supérieur à 12) la formation de diacétyl à partir de l' α AL demeure négligeable. Nous avons montré qu'à pH inférieur à 1,5 l' α AL est intégralement transformé en acétoïne (50).

DISSOCIATION DE L' α ACETOLACTATE EN DIACETYLE
AU COURS DE LA DISTILLATION EN FONCTION DU pH.



INFLUENCE DU rH sur la stabilité de solutions
d' α cétohydroxyacides.

Fig:13

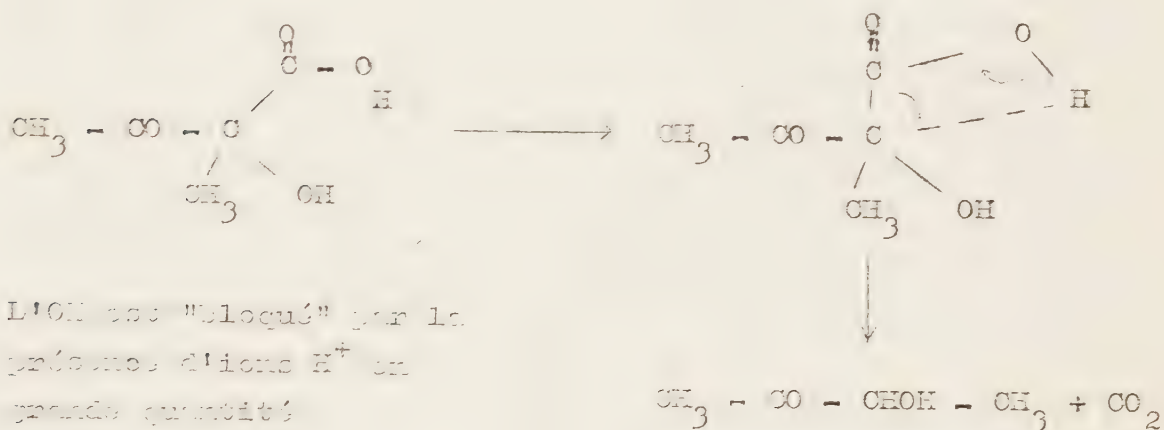


Si la décomposition restait relativement faible à 20°C, elle est pratiquement totale à 100°C pour des pH compris entre 4 et 6.

D'autre part dans un milieu très réducteur l'AL reste stable alors qu'il est totalement décomposé en milieu oxydant.

On peut interpréter les résultats de décomposition précédents à l'aide des mécanismes chimiques suivants :

- 1) décarboxylation avec formation d'acétoïne en présence d'une grande quantité de protons



- 2) Décomposition avec formation d'acide formique et de diacétyle

Il se pourrait d'après Reininen (63) que l'on puisse dans des conditions voisines de celles d'un milieu en fermentation, obtenir de l'acide formique et du diacétyle. Seule une étude de décomposition de $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_4$ est permis

de préciser le sort du groupement carboxyl lors de la décomposition.

Cependant en présence d'accepteur d'électrons dans le milieu il ne pourrait pas y avoir formation d'H-COOH mais seulement de CO_2 et du diacétyle.

3) décomposition à pH basique

Il y aurait possibilité de clivage de la molécule.

B) Dosage différentiel des dicétones et des cétohydroxyacides

Les résultats précédents nous ont permis de proposer une méthode de dosage basée sur l'acidification préalable du milieu fermentaire contenant les cétohydroxyacides.

Nous avons montré précédemment que 1'0%AL en solution à pH compris entre 4 et 6 était transformé en diacétyle. Le dosage colorimétrique permet alors l'estimation globale du diacétyle natif et de 1'0%AL décomposé en diacétyle.

Par contre une acidification du milieu à pH 1,5 permet la décarboxylation de 1'0%AL en acétoïne : on dose alors seulement le diacétyle natif.

Cette observation constitue l'idée fondamentale de la méthode que nous proposons.

Mode opératoire :

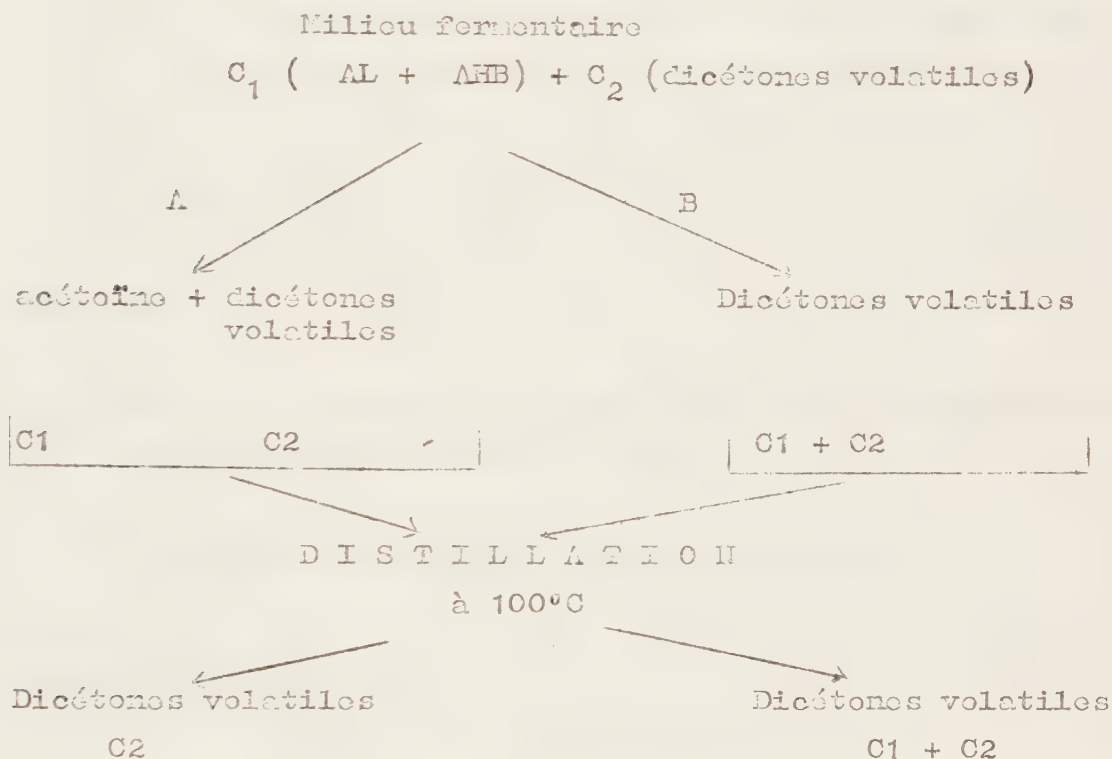
Le milieu fermentaire est divisé en deux parties aliquotes de 25 ml : A et B.

A : Acidification à pH 1,5 par H_2SO_4 6N dans un ballon jaugé de 100 ml. On porte ensuite au volume et le mélange

est distillé à la pression atmosphérique. On recueille 25 ml de distillat qui sont soumis à analyse (colorimétrique ou chromatographique).

B : L'autre partie aliquote portée à pH 4,5 est distillée dans les mêmes conditions que ci-dessus.

On peut schématiser ainsi ce dosage :



Par différence entre les résultats obtenus après traitement normal (B) et traitement acide (A) on peut estimer la quantité C_1 d' α Acétohydroxyacides présente dans le milieu à l'instant du prélèvement. De même on obtiendrait la concentration C_2 de dicétones volatiles.

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse des milieux fermentaires soumis à ce traitement (acidification (A) distillation simple (B)) devait confirmer le bien fondé de notre méthode (Fig. n° 18).

Domaine de validité du dosage

Cette méthode nous a permis de suivre avec succès l'apparition de l'QAL dans des fermentations à inoculum massif de levures (C2), ainsi que sa décomposition dans des solutions tampons. Pour de faibles quantités de dicétones et d'Q cétohydroxyacides d'une part et pour différencier diacétyle du 2-3 pentanedione d'autre part nous avons analysé les distillats par chromatographie en phase gazeuse avec capture d'électrons. (§ 04).

C) Mise en évidence de l'accumulation des Q cétohydroxyacides et des dicétones dans le milieu

1) Fermentation à faible inoculum de levures

Matériel : fioles de 1 litre à appendice (la culture est suivie par turbidimétrie)

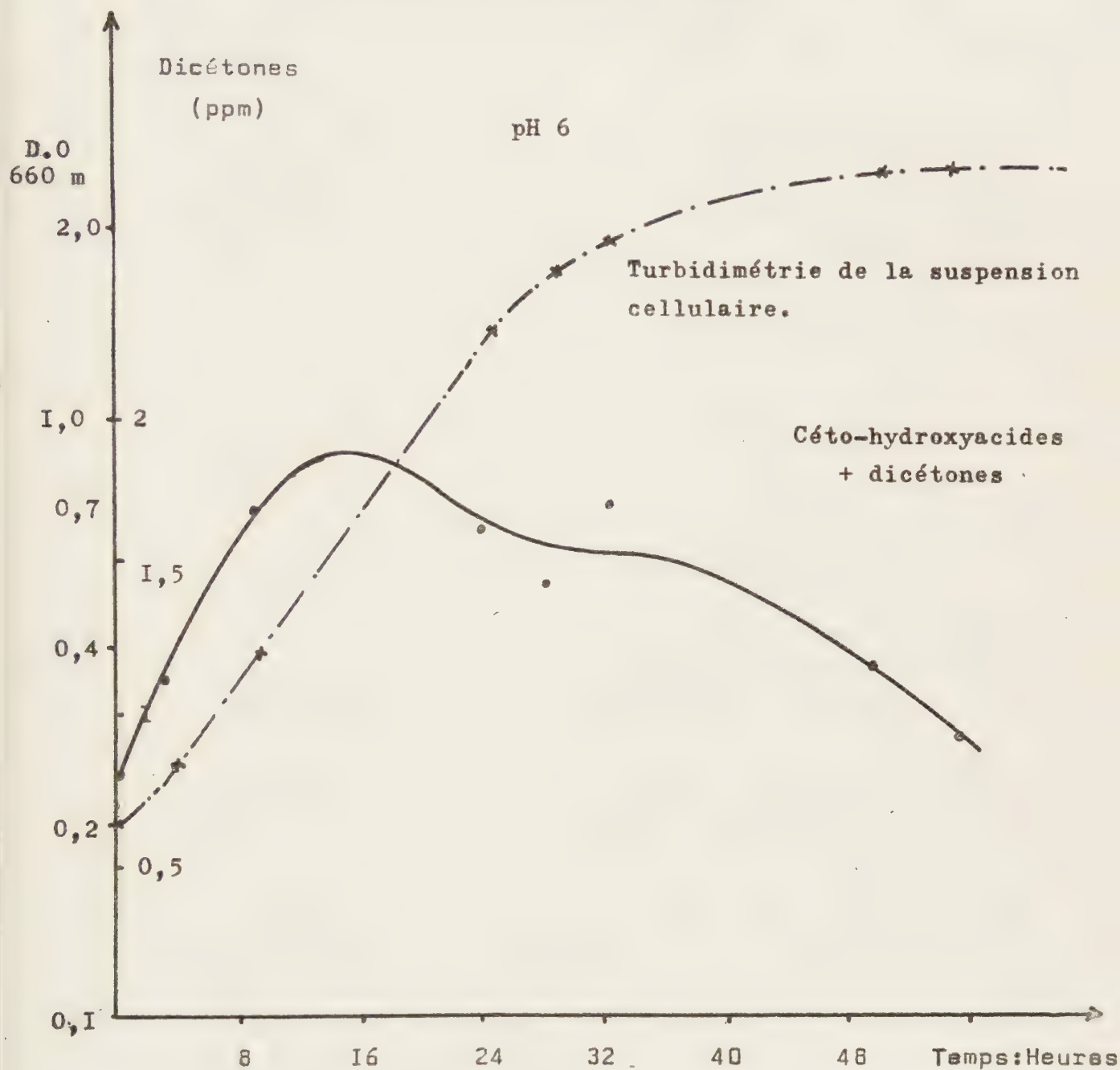
souche 245 S. Carlsbergensis.

Il ressort des résultats (Fig. n° 14), que la production de dicétones et de précurseurs est trop peu importante dans ce type de fermentation, pour que l'on puisse tirer des conclusions définitives. Il semblerait toutefois que la formation des cétohydroxyacides se fasse durant la phase exponentielle de croissance.

PRODUCTION D'ACETO-HYDROXYACIDES ET DE DICETONES
VOLATILES AU COURS DE LA FERMENTATION.

Souche sauvage 245 *S. Carlsbergensis*.

Faible inoculum de levures.



On peut donc penser au schéma de formation suivant :

L'excédent, d' α cétohydroxyacides biosynthétisés par la cellule est excrété et se décompose en dicétones, qui seront alors réduites en alcools.

En tenant compte de ces considérations et de la lente décomposition de l' α AL en diacétyl, nous avons cherché à obtenir des quantités plus importantes d' α cétohydroxyacides. Nous nous sommes placés dans les conditions suivantes :

- la levure est en pleine phase de croissance
- la durée de fermentation est réduite au minimum.

Un ensemble ent d'un milieu riche en glucose à l'aide d'un inoculum important de levures, nous permettait de réaliser ces conditions.

2) Fermentation avec un inoculum massif de levures

Dans ce type de fermentation (18°C ; pH 4,5 ; 28 mg/ml de levure centrifugée ; agitation ; 10 % de glucose) le glucose est entièrement utilisé en 6 à 10 heures.

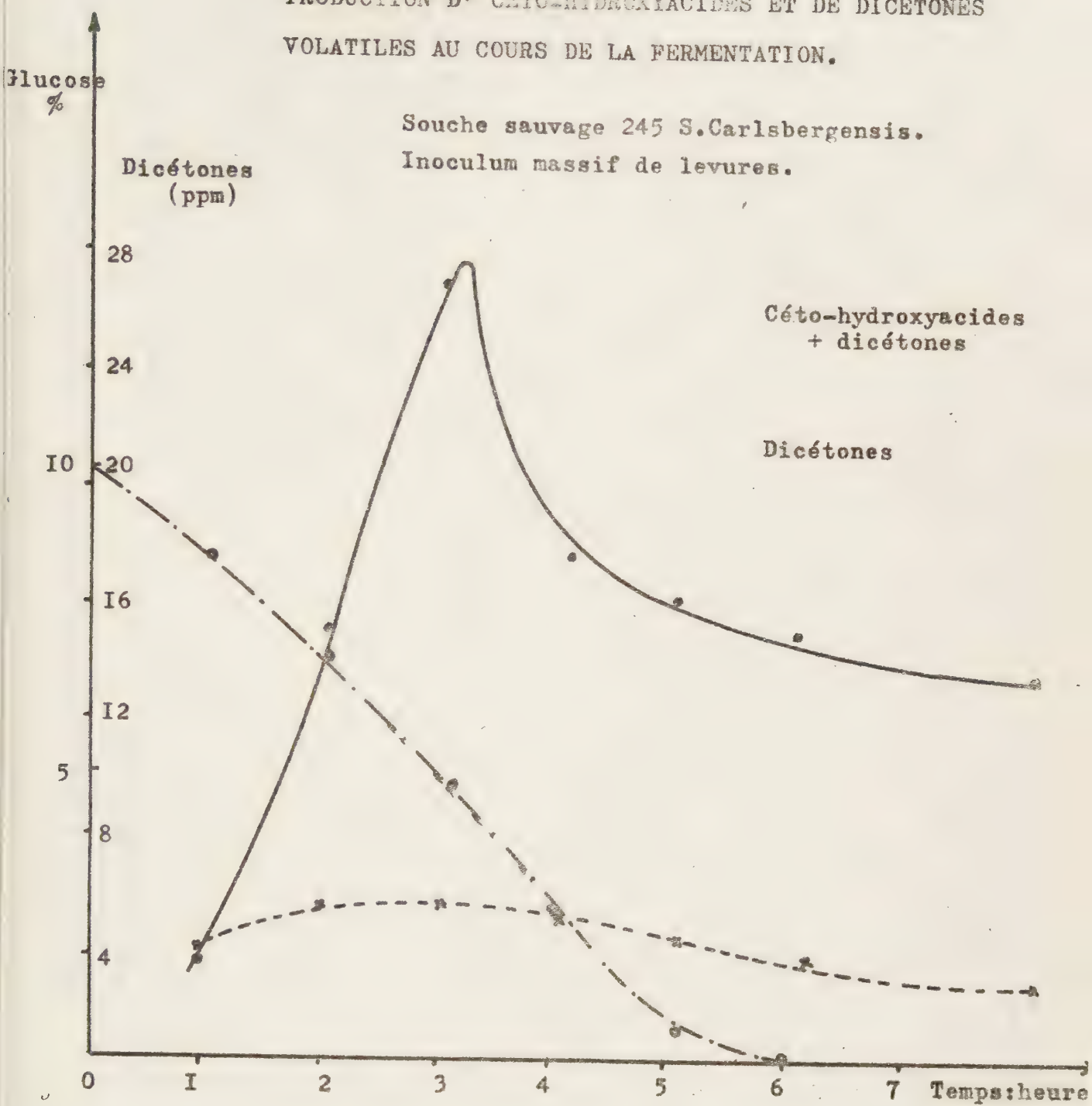
Résultats : Figure n° 15 : souche 245 *S. Carlsbergensis*
Figure n° 16 : souche 320 *S. Corevisiae* (n)

Nous mettions ainsi en évidence de manière indirecte la présence de dicétones et de leurs précurseurs dans le milieu fermentaire. Nous pouvions remarquer d'autre part l'importante différence de production de dicétones entre les deux souches étudiées ci-dessus.



PRODUCTION D' CETO-HYDROXYACIDES ET DE DICETONES
VOLATILES AU COURS DE LA FERMENTATION.

Souche sauvage 245 *S.Carlsbergensis*.
Inoculum massif de levures.



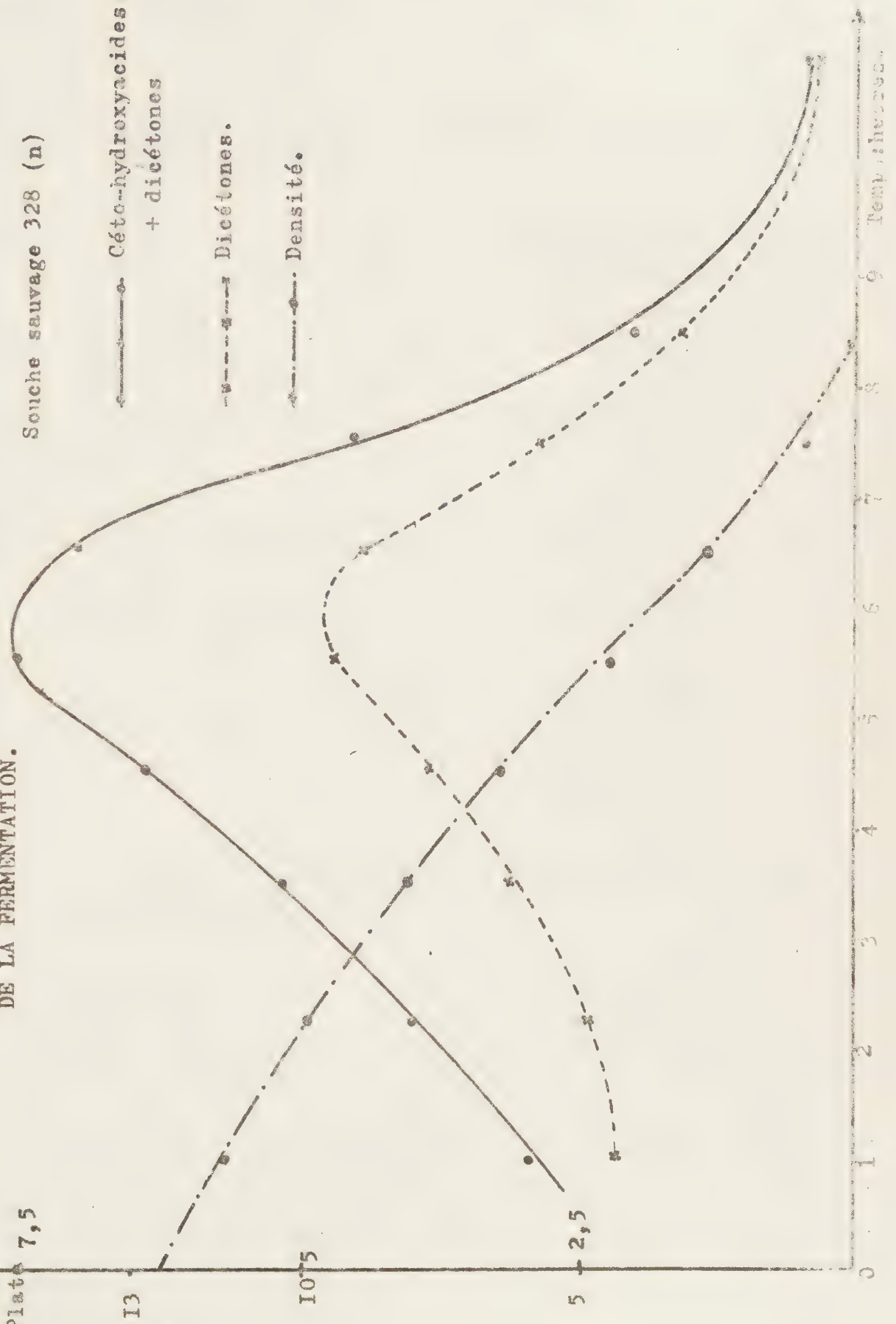
Dicétones
(ppm)

PRODUCTION D'ACÉTO-HYDROXYACIDES ET DE DICÉTONES VOLATILES AU COURS
DE LA FERMENTATION.

Souche sauvage 328 (n)

Densité
Coplata 7,5

—●— Céto-hydroxyacides
+ dicétones
- - - - - Dicétones.
- · - · - Densité.





3) Chromatographie sur couches minces des hydrazones du milieu fermentaire

Une analyse du milieu par chromatographie sur couches minces des DNP hydrazones a mis en évidence directement la présence des précurseurs et des dicétones. Le milieu fermentaire avait été prélevé au moment de la formation optimale de cétohydroxyacides.

Les résultats obtenus sont portés dans le tableau ci-dessous :

Rf des témoins purs		Rf des D.N.P. du milieu
Témoins	Rf AL = 0,62	a Rf = 0,62
	Rf DA = 0,52	b Rf = 0,50
	Rf acétoïne = 0,30	c Rf = 0,34
	Rf glyoxal = 0,42	d Rf = 0,43
	Rf 2-3 P = 0,81	e Rf = 0,77
		f Rf = 0,10
		g Rf = 0,05

Les DNP séparés à partir du milieu pouvaient donc être ainsi identifiés :

a = α AL	d = glyoxal
b = DA	e = 2-3 pentanedione
c = acétoïne	f et g n'ont pas été identifiés

Cette étude de chromatographie sur couches minces nous permettait d'identifier les dicétones du milieu ainsi que certains de leurs précurseurs. Nous n'avons toutefois pas pu mettre en évidence la présence d' α AHB.

4) Chromatographie en phase gazeuse

Le détecteur par ionisation de flamme est sensible à l'acétoïne mais ne permet pas de distinguer dans un mélange complexe (milieu fermentaire) les dicétones volatiles. (Fig; n°17)

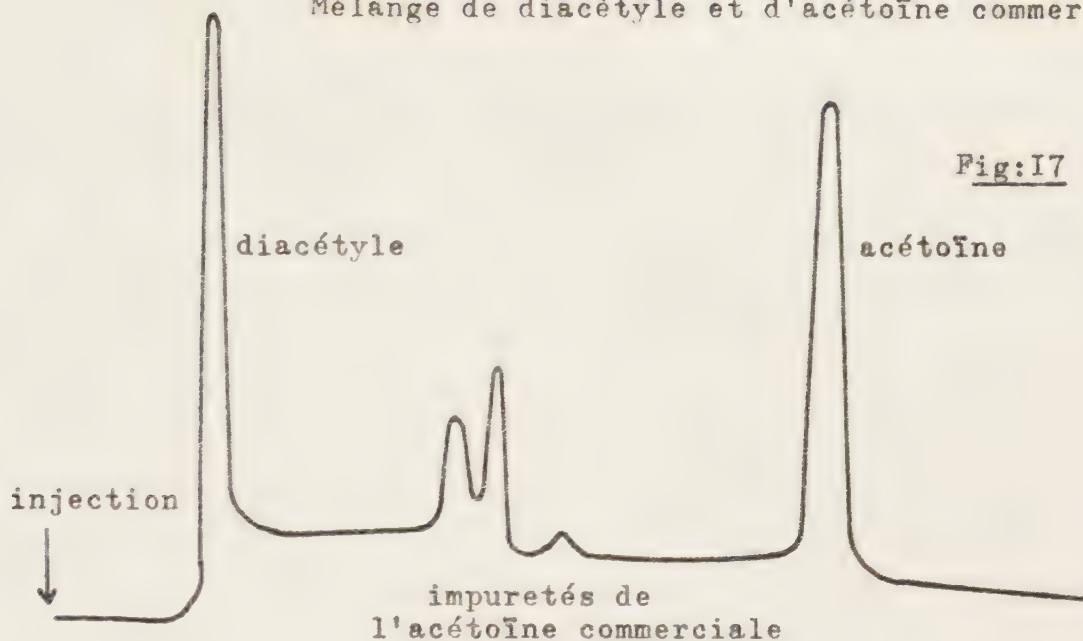
Le détecteur par capture d'électrons nous a permis de distinguer diacétyl et 2-3 pentanedione (Fig. n° 18). L'analyse du distillat de milieu fermentaire traité comme indiqué précédemment nous a permis de montrer que l'α AHB se comporte de manière analogue à l'α AL. Nous avons ainsi un moyen de réaliser le dosage différentiel des deux dicétones ainsi que leurs précurseurs.

Nos fermentations seront contrôlées systématiquement à l'aide de cette technique.

-:-:-:-:-

Chromatographie en phase gazeuse: ionisation de flamme.

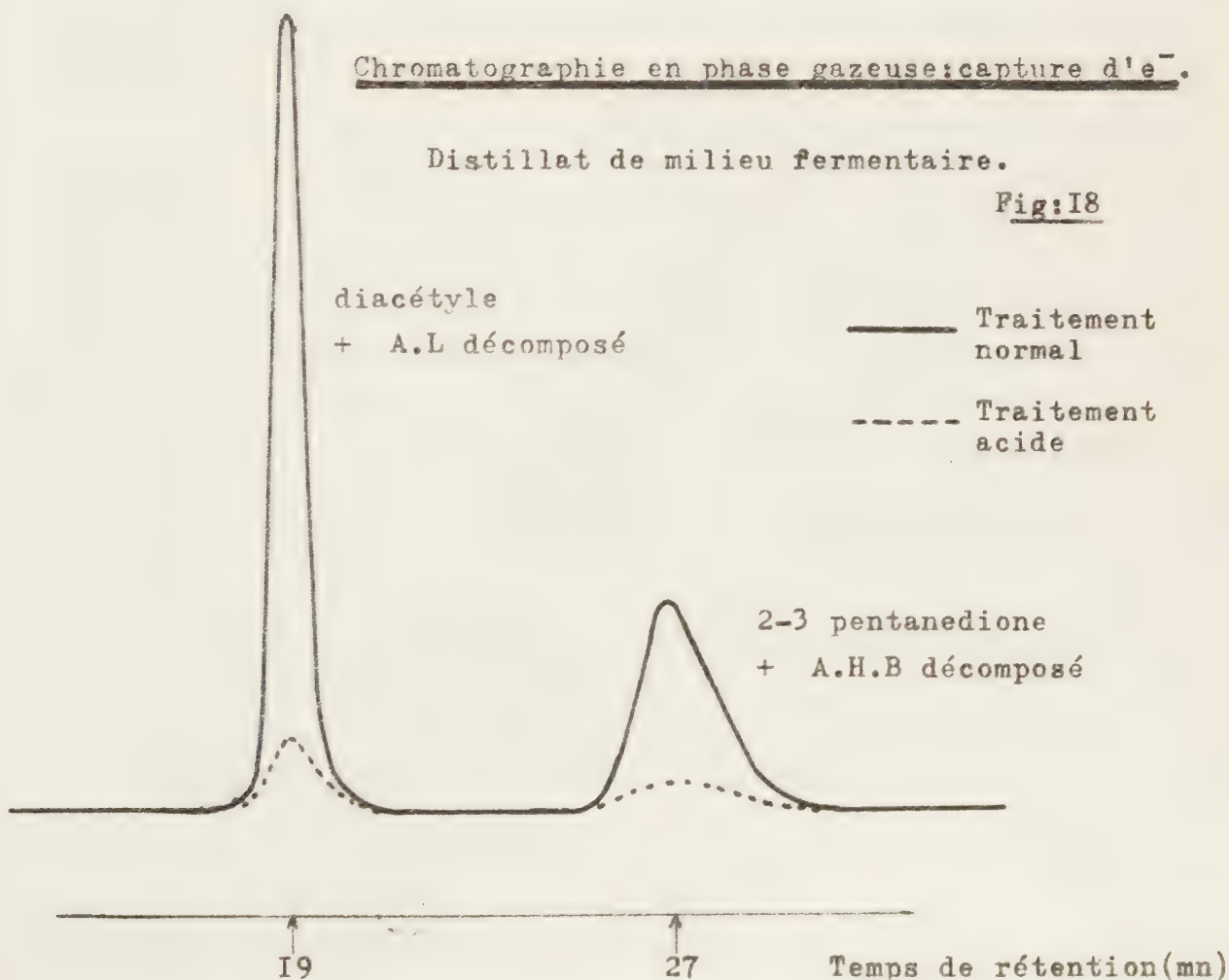
Mélange de diacétyle et d'acétoïne commerciales.



Chromatographie en phase gazeuse: capture d'e⁻.

Distillat de milieu fermentaire.

Fig: I8





2) ETUDE DU MECANISME DE FORMATION DES DICETONES VOLATILES A L'AIDE DE MUTANTS AUXOTROPHES (47)

Sur la base des résultats précédents confirmant plusieurs publications récentes (6,7) nous pouvons conclure avec certitude à l'intervention des α acétohydroxyacides dans la formation des dicétones.

Cependant ce mode de formation est-il exclusif ? L'hypothèse de formation directe du diacétyl avec un système enzymatique propre, comme c'est le cas chez les bactéries, n'était pas directement infirmée par nos résultats précédents.

D'autre part les arguments avancés, concernant le rôle de précurseurs de l' α AL, étaient-ils vrais pour l' α AFB ?

Enfin la résolution du problème de formation des dicétones volatiles, pour être complète devait permettre d'en proposer un contrôle efficace dans des fermentations industrielles.

Ces questions nous ont orienté vers une méthode de recherche directe et exclusive. L'emploi de mutants auxotrophes pour la valine et l'isoleucine, dépourvus des enzymes impliquées dans la formation des précurseurs, semblait répondre à ces critères. L' α acétohydroxyacide synthétase (42) apparaissait comme l'enzyme-clé de la formation des dicétones. (Diacétyl et 2-3pentanedione). La thréonine désaminase (31) catalysant la formation de l' α cétobutyrate précurseur de l' α acétohydroxybutyrate apparaissait impliquée dans la formation de la 2-3 pentanedione.

A) Activités enzymatiques de la thréonine désaminase et de l' α acétohydroxyacidesynthétase

Nous avons effectué une étude préalable de l'activité



des deux enzymes E_1 et E_2 pour chercher à établir une corrélation entre taux d'activité enzymatique et production de dicétones volatiles.

Thréonine désaminase : souche sauvage 320 (n)

Les cultures sont faites sur milieu n° 3 en fioles de 1 litre. La récolte est faite en phase exponentielle de croissance. L'extrait enzymatique et le dosage sont effectués de la manière indiquée au chapitre IV.

Les résultats sont indiqués sur la Figure n° 19.

L'activité des NaDH'oxydases (---) apparaît négligeable dans ce type d'extrait. Deux cultures indépendantes ont donné les résultats suivants pour l'activité de la thréonine désaminase.

1 - 2000 n moles/min/mg de prot/	Fig. n° 19
2 - 1850 n moles/min/mg de prot/	Fig. n° 26

Acétohydroxysynthétase :

Les dosages de la synthétase ont été effectués sur deux souches haploïdes sauvages et dans des conditions de croissance et de milieu permettant d'évaluer l'effet régulateur de la valine et de l'isoleucine.

Dans ce but une étude comparée a été menée en effectuant des cultures sur différents milieux.

- récolte des levures en fin de phase de croissance exponentielle sur milieu minimal supplémenté ou non avec de la valine ou de l'isoleucine. (Tableau 1)



ABSORPTION
à 340 m μ

Fig:19

DOSAGE DE LA THREONINE DESAMINASE

Souche sauvage 328

Extrait : 12 mg/ml de protéine

NADH oxydase 30 μ l

essai: 30 μ l

essai: 60 μ l

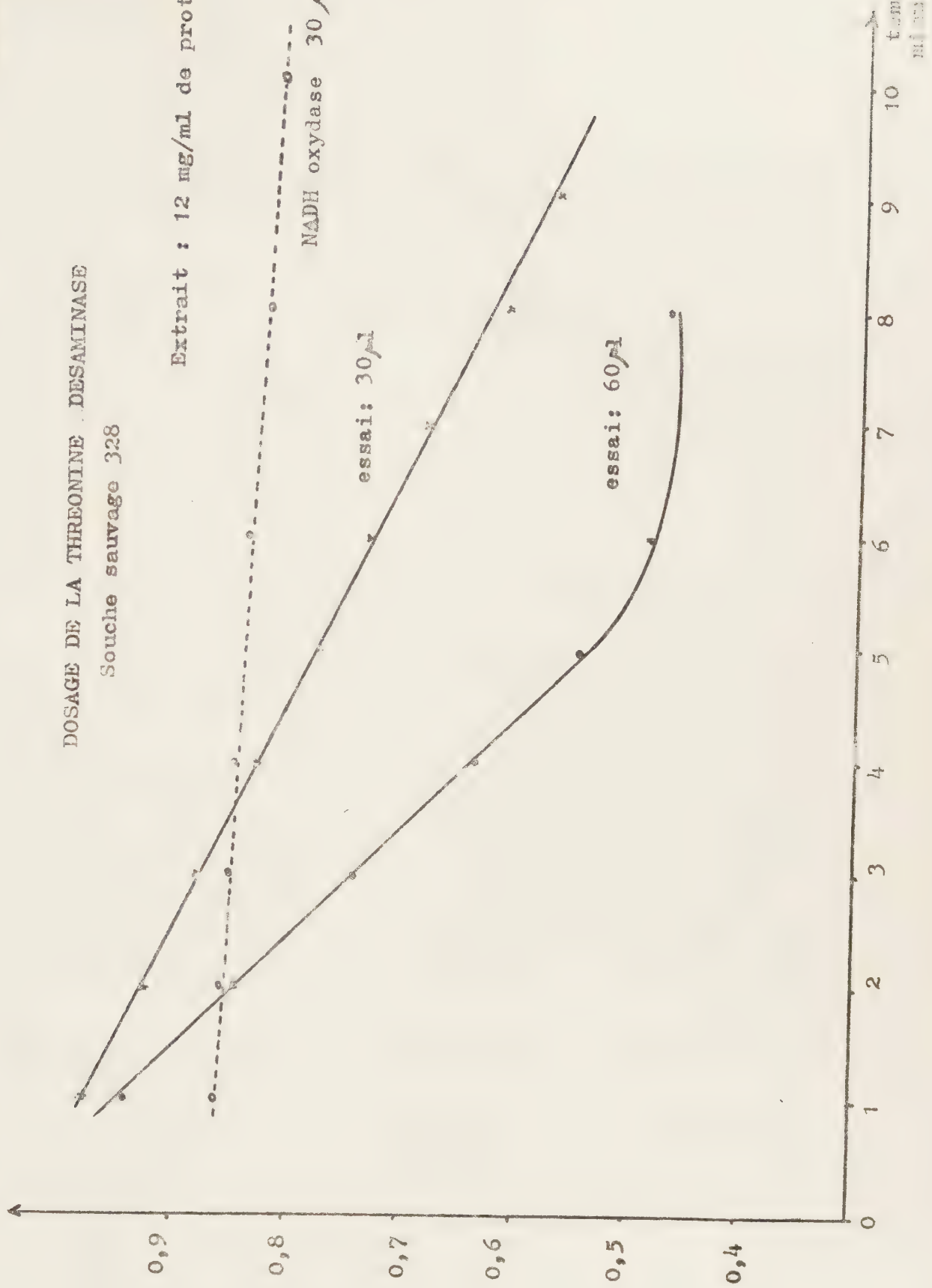




Tableau 1 : dosage de l'activité synthétasique (exprimée en n moles/mg de poids sec/30 mn de réaction d' 14 CAL

souches employées	source d'azote	
	NH_4 2 még : N	Valine + isoleucine 2 még : N
264 (2 B)	284	240
328	430	390

L'examen de ces résultats montre que les différences sont peu marquées pour les milieux envisagés, à condition d'effectuer la récolte de cellules en fin de phase exponentielle de croissance ce qui correspond en fait à l'épuisement de la source azotée. Il n'en est pas de même lorsque la récolte est effectuée durant la phase exponentielle de croissance puisque nous obtenons pour la souche 264 B des activités ne dépassant guère 150. L'effet régulateur de la valine et de l'isoleucine apparaît mieux lorsque la culture est effectuée comme le montre le tableau 2 sur milieu complet.

Tableau 2 : activité synthétasique de la souche sauvage 328 en culture sur milieu complet n° 3

Récolte mg Pds sec/l	Activité n moles/mg Pds sec/30 mn
2000	377
1200	345
800	230
400	170



Notons encore l'instabilité de la synthétase (32) lorsque les mesures sont effectuées en phase stationnaire tardive. Nous obtenons en effet pour la souche 264 2 B après 14 heures de phase stationnaire une activité de 27 contre une activité de 240 en fin de phase exponentielle de croissance. (Tableau 3)

Tableau 3 : activité synthétasique de la souche 264 2 B sur milieu suplémenté avec valine + isoleucine (2 mEq : l)

Récolte mg Pds sec/l	activité n moles AL/mg Pds sec/30 mn
800	240
554	200
345	150
Après 14 h de phase stationnaire	27

Comparaison de l'activité de E_2 chez la souche diploïde (157) et la souche haploïde (328) dans des conditions identiques de culture.

Les prélèvements sont effectués en phase exponentielle de croissance sur milieu minier.

Souches	Activités de E_2 n moles AL/mg de Pds sec et par 30 mn
328 (n)	430
157 (2n)	370



Sachant d'autre part que pour une même densité optique de suspension cellulaire on a 2,18 fois plus de cellules haploïdes que de diploïdes (d'après l'échelonnage DC - Nombre de cellules voir chapitre IV § 3).

Le rapport des activités de E_2 (activité spécifique rapportée à une cellule) chez le diploïde et l'haploïde s'établit comme suit :

$$\begin{array}{l} \text{Activité spécifique : } 157 \text{ (2n) (rapportée à 1 cellule)} \\ \hline \text{Activité spécifique : } 328 \text{ (n) (rapportée à 1 cellule)} \end{array} \quad \neq$$

$$= \frac{370 \times 2,18}{430} = 1,87$$

Le rapport des activités de E_2 chez le diploïde et l'haploïde est pratiquement égal au rapport des volumes cellulaires de ces deux souches. (Voir chapitre IV § 3)



B) Prospection de mutants auxotrophes I^-V^- dépourvus de synthétase (E_2)

Nous avons commencé à rechercher parmi les mutants I^-V^- qui avaient été mis à notre disposition par Mme GRENSON (MG583 , MG 23, MG 1046) et par M. TROUVENOT (461) (49) des souches dépourvues de E_2 . Ces souches étaient issues respectivement des souches 1278 b et 264 2 B. Les mesures d'activité synthétasique ont été effectuées après croissance sur milieu complet n° 3. La récolte est effectuée en fin de phase exponentielle de croissance.

Tableau 4 : activité synthétasique des mutants MG

Souches testées	Phénotype	Milieu de culture	Activité E_2
MG 23	I^-V^-	n° 3	630
MG 1046	I^-V^-	n° 3	190
MG 583	I^-V^-	n° 3	100
1278 b	sauvage	n° 3	430



Tableau 5 : activité synthétasique du mutant 461 en fonction de sa croissance sur milieu n° 2 complété avec valine + isoleucine (2 nég : II)

Souches testées	Phénotype	HC ₄ de récolte mg Pds sec/l	activité E ₂
461	I ⁺ V ⁺	150	350
		350	480
		550	930
		600	1200
264 2 B	sauvage	345	150
		554	200
		800	240

Nous remarquons une activité synthétasique très différente chez ces mutants (Tableau 4 et 5). En particulier la souche 461 qui a une activité de 1200 en fin de phase exponentielle contre une activité de 240 à la souche sauvage cultivée dans les mêmes conditions.

Aucune de ces souches n'est dépourvue de synthétase. Nous avons également étudié la souche RG 103 quant à sa production de dicétones volatiles, comme ayant un niveau synthétasique sensiblement plus faible que la souche sauvage que nous étudions. Nous avons en effet constaté que la production de dicétones volatiles apparaît inférieure à celle de la

souche sauvage 328 (Fig. n° 27).

Il apparaît par ailleurs que cette souche présente un comportement particulier vis-à-vis de la valine et de l'isoleucine (Fig. n° 22).

On peut émettre l'hypothèse que le besoin unique en valine de ce mutant est dû à une mutation suppressor (52).

Après l'issue de cette prospection, nous avons produit des souches mutantes I⁻V⁻ à partir de la souche haploïde 328 (n).

3) Production des mutants auxotrophes I⁻V⁻ (voir chapitre IV)

1) Recherche des conditions optimales de mutagenèse de la souche haploïde 328 (n)

En fonction de la courbe de létalité établie (Fig. n° 20) nous avons choisi une concentration d'I.B.M.S. de 1 % pour un temps d'action de 3 heures à 28°C dans un tampon pH 7,4. On obtient dans ces conditions une létalité d'environ 60 %.

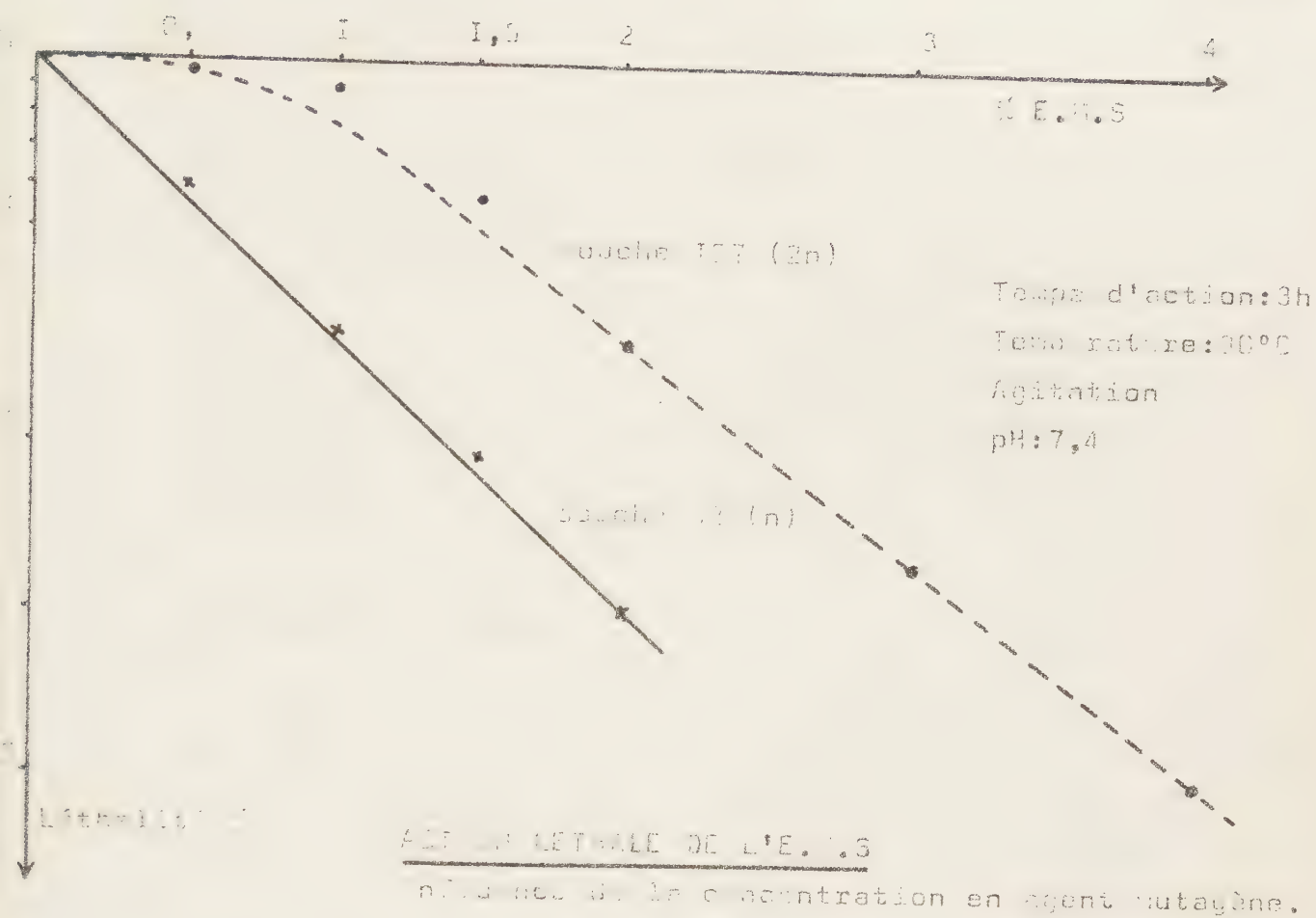
2) Concentration optimale d'agent de sélection (Nystatine)

Nous avons choisi une concentration de 4 U/ml, qui provoque une létalité de 99,5 % dans une population de cellules prototrophes en phase exponentielle de croissance (Résultats Fig. n° 20). Le temps d'action de la nystatine était de 1 h 30 à 28°C en tampon pH 4,2.

Les résultats de létalité en fonction de la concentration de nystatine étaient peu reproductibles. Deux explications se présentent :

D'une part un manque d'homogénéité de la poudre de

Fig:20



Action de la nystatine sur les souches 328(n)
 et 157(2n).

Nystatine	Léthalité	
	souche 328(n)	souche 157(2n)
20	60 à 99,5%	80%
40	99,5 à 99,9%	85%
80		91%
160		93%
320		95,5%

nystatine, ne permet pas de préparer des solutionsières de concentration identiques.

D'autre part, la nature même de la suspension de cellules (souche 328) qui ont tendance à former de nombreux agrégats, fausse les résultats de létalité (inclusion de la suspension traitée, dans de la gélose nutritive surfondue). La phase de sélection est précédée d'une privation d'azote que nous avons fixé à 24 heures, étant donné que le palier de phase stationnaire est atteint après 18 heures.

3) Résultats obtenus

Nous avons isolés 16 mutants de phénotypes I⁻V⁻, I⁻ et L⁻. Les mutants L⁻ bien que ne nous intéressent pas pour l'instant, doivent fournir un matériel d'étude de la production des alcools supérieurs liés au métabolisme de la leucine.

Phénotype	Type a ou	Origine	Référence des souches isolées
I ⁻ V ⁻	a	328 (n)	C ₁ ; C ₂ ; C ₃ ; C ₄
I ⁻	a	328 (n)	C ₅ ; C ₁₂ ; C ₁₁ ; C ₁₆ ; C ₇ ; C ₈
L ⁻	a	328 (n)	C ₆ ; C ₉ ; C ₁₀ ; C ₁₃ ; C ₁₄ ; C ₁₅

4) Caractérisation physiologique des mutants obtenus

Nous avons caractérisé les mutants obtenus par l'étude de croissance sur milieux liquides supplémentés avec les

acides aminés : valine, isoleucine et leucine. Les résultats de ces études de croissance pour les mutants C_1, C_5, C_6 ainsi que pour la souche sauvage 328 (n) sont portés en figure n° 21, 22, 23, 24, 25.

L'examen des courbes de croissance confirme les exigences constatées sur milieu solide. Ceci nous permet de conclure que le mutant C_1 (Fig. n° 23) qui exige simultanément la valine et l'isoleucine pour croître pourrait être dépourvu de synthétase. (E_2). Le mutant C_2 présentait les mêmes caractéristiques de croissance que le C_1 . Le C_3 et le C_4 n'ont pas été retenus ayant des comportements physiologiques anormaux (croissance lente : temps de doublement de population : 6 heures).

Le mutant C_5 (Fig. n° 24) nécessite seulement l'isoleucine. Il pourrait s'identifier avec un thréonine désaminase-.

Le mutant C_6 (Fig. n° 25) ne croît qu'en présence de leucine. Son défaut enzymatique sera localisé dans la chaîne biosynthétique menant de l' α -acétoisovalérate à la leucine.

5) Caractérisation enzymatique des mutants

Mutants I^-V^- : dosage de E_2

Dans l'immédiat nous recherchions des mutants dépourvus de synthétase. Nous avons donc testé les souches auxotrophes pour la valine et l'isoleucine.

Culture sur milieu n° 2 supplémenté avec valine + isoleucine. (Voir tableau 6)



Fig:2I

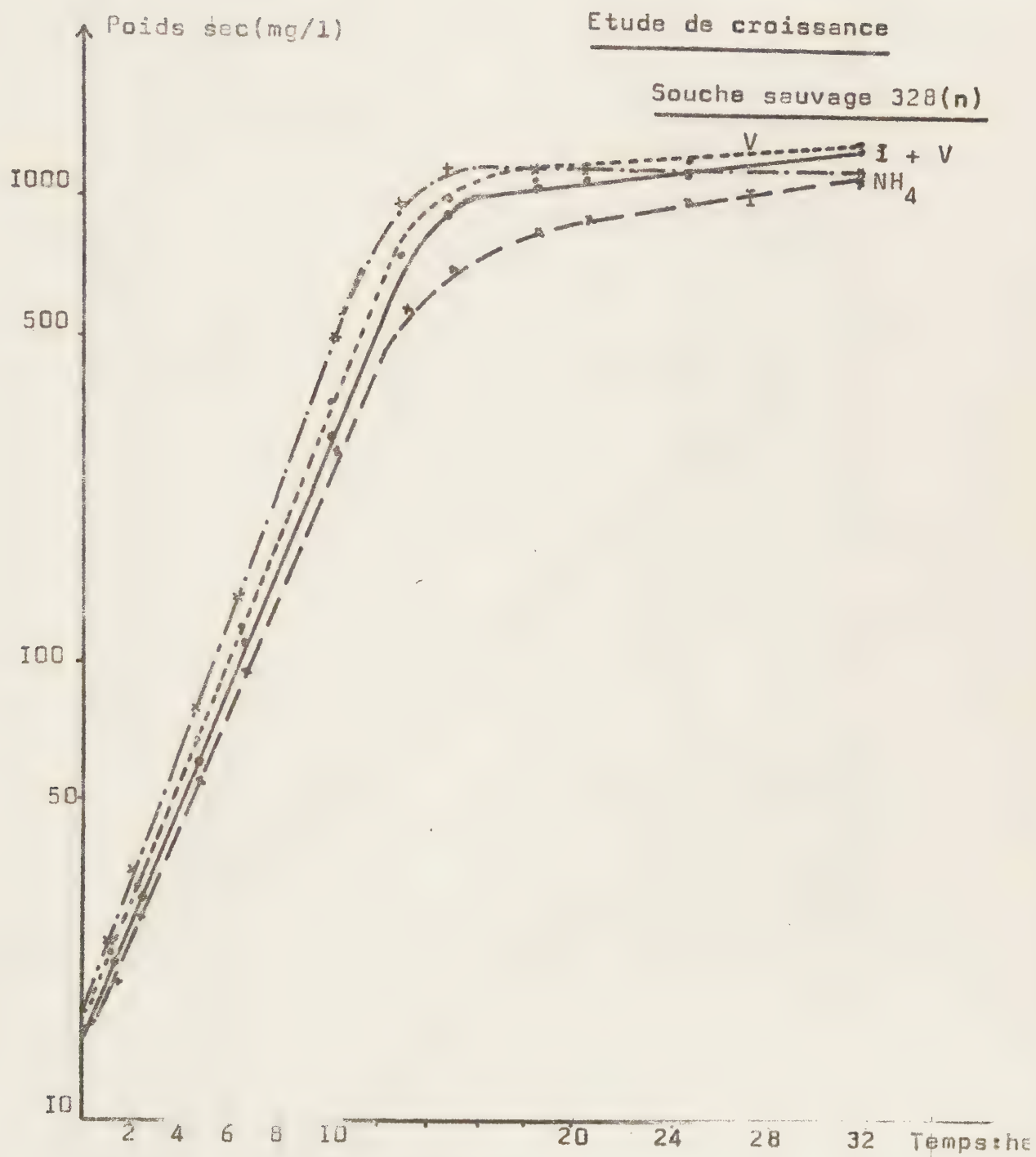
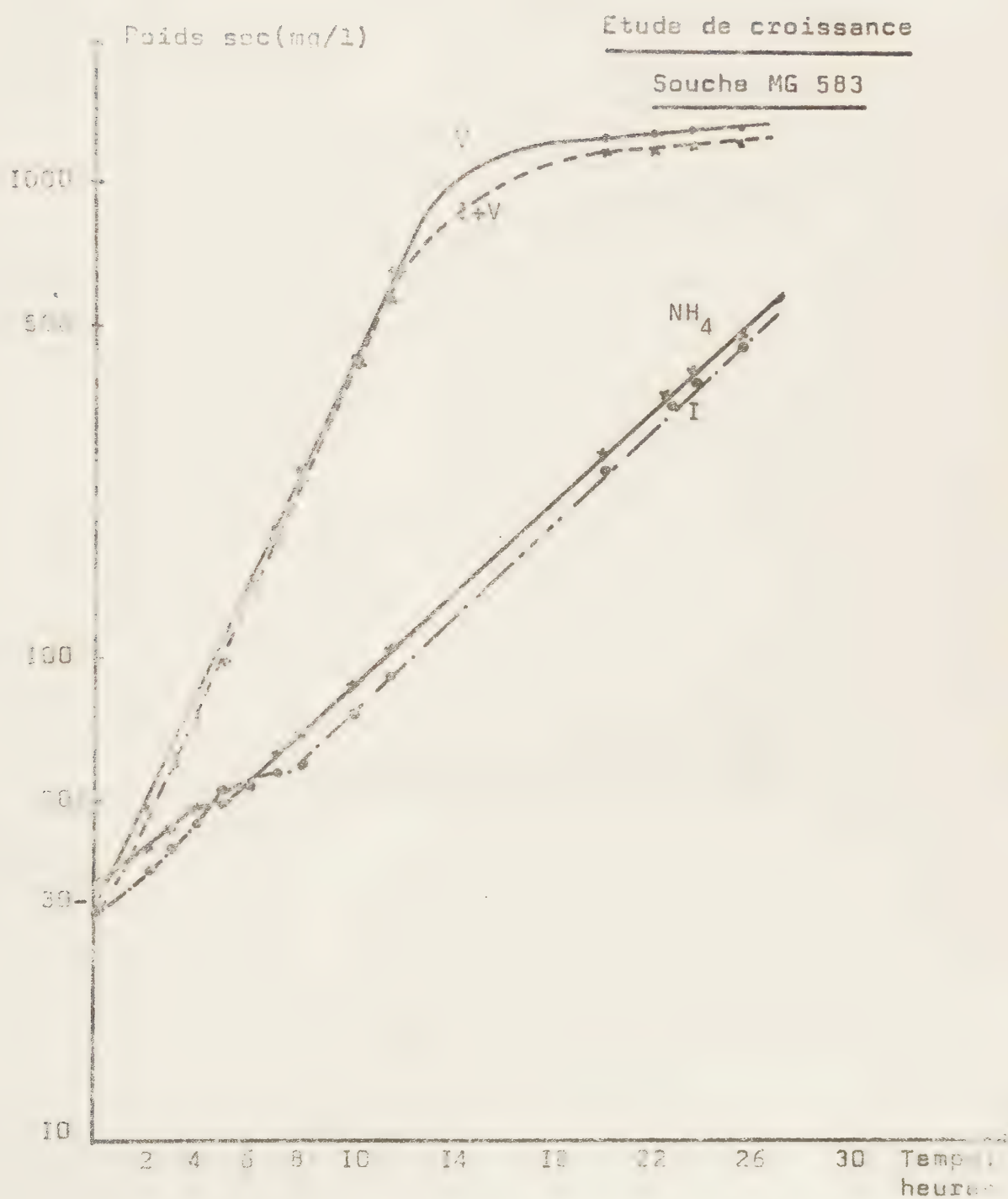
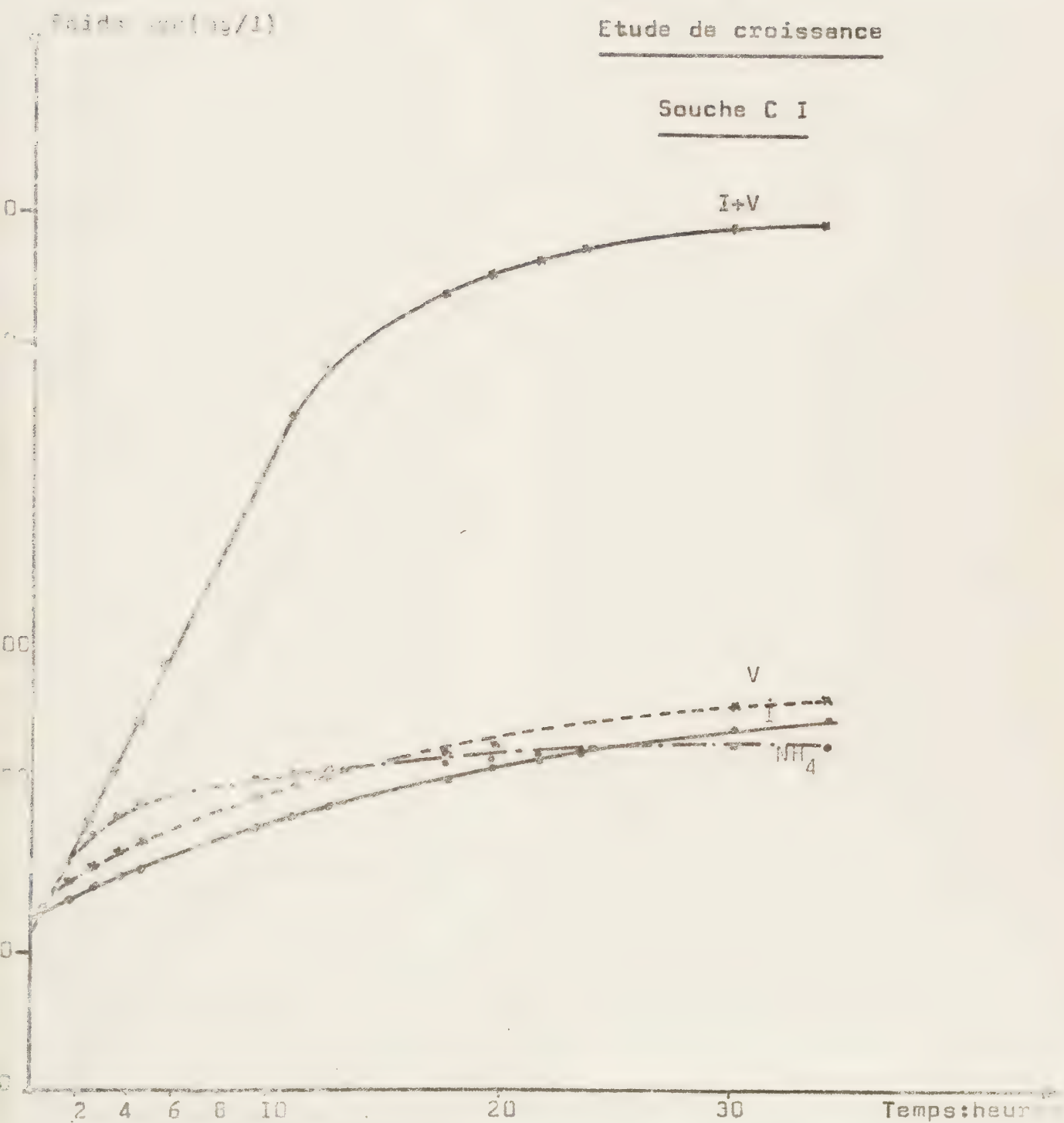
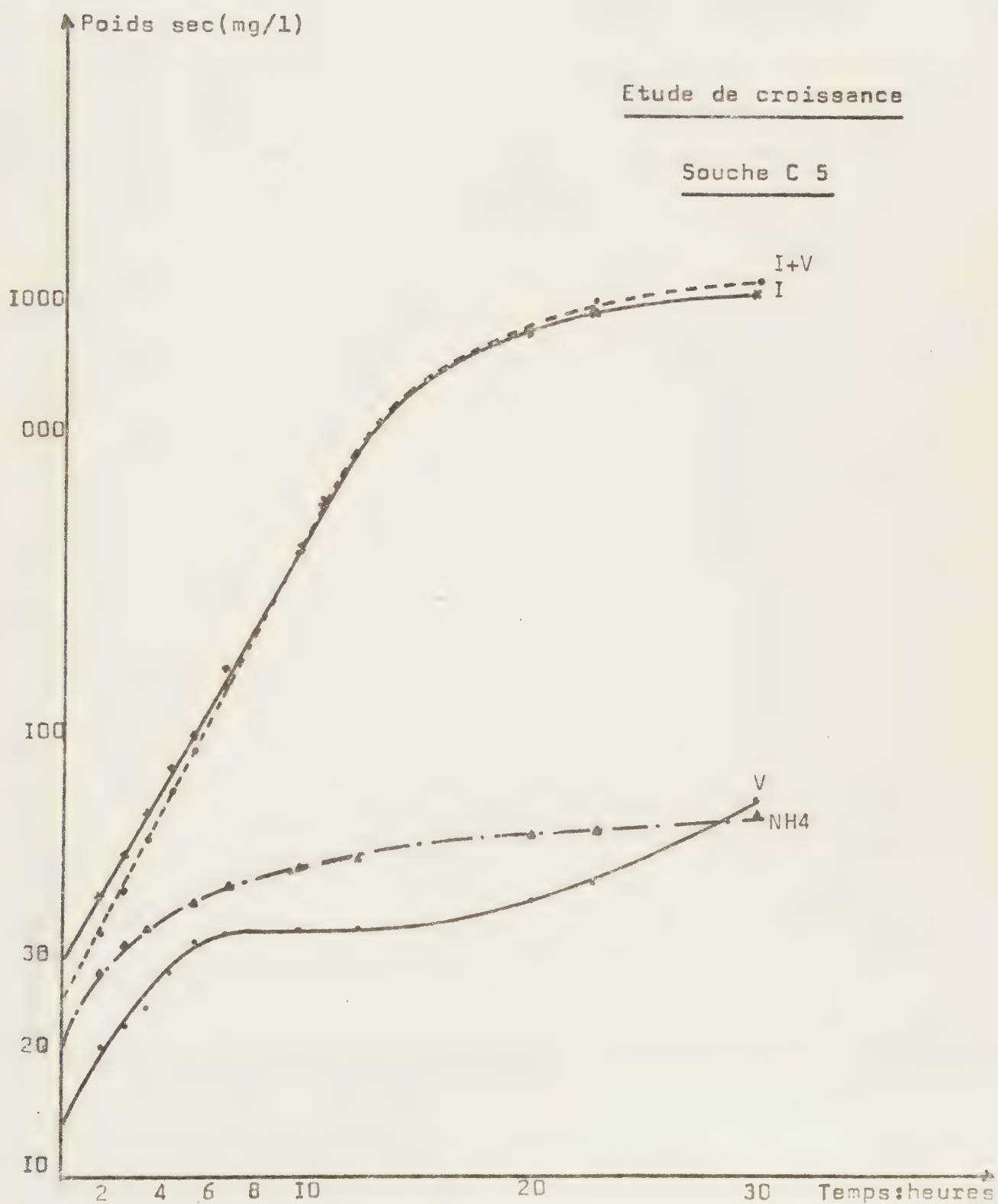


Fig:22







Poids sec (mg/l)

Etude de croissance

Souche C₆

L

1300
1000

500

100

50

20

NH₄

Fe

Temps (h)

10

20

30

40

Tableau 6 : activité de E_2

Souche	Phénotype	Activité synthétasique n moles d'Q AL/mg Pds sec/30 mn
C_1	I^-V^-	2
C_2	I^-V^-	420
328	Sauvage	390

Le mutant C_1 apparaît donc dépourvu presque totalement de synthétase . On peut d'ailleurs penser que cette activité résiduelle de E_2 est due à la présence de quelques révertants dans les cultures testées.

Mutant I^- : dosage de E_1

Nous avons testé le mutant C_5 de phénotype I^- , pour vérifier qu'il était effectivement dépourvu de E_1 : le phénotype I^- peut en effet être du à une mutation suppresseur d'un mutant présentant initialement la double auxotrophie (valine et isoleucine) (51,52)

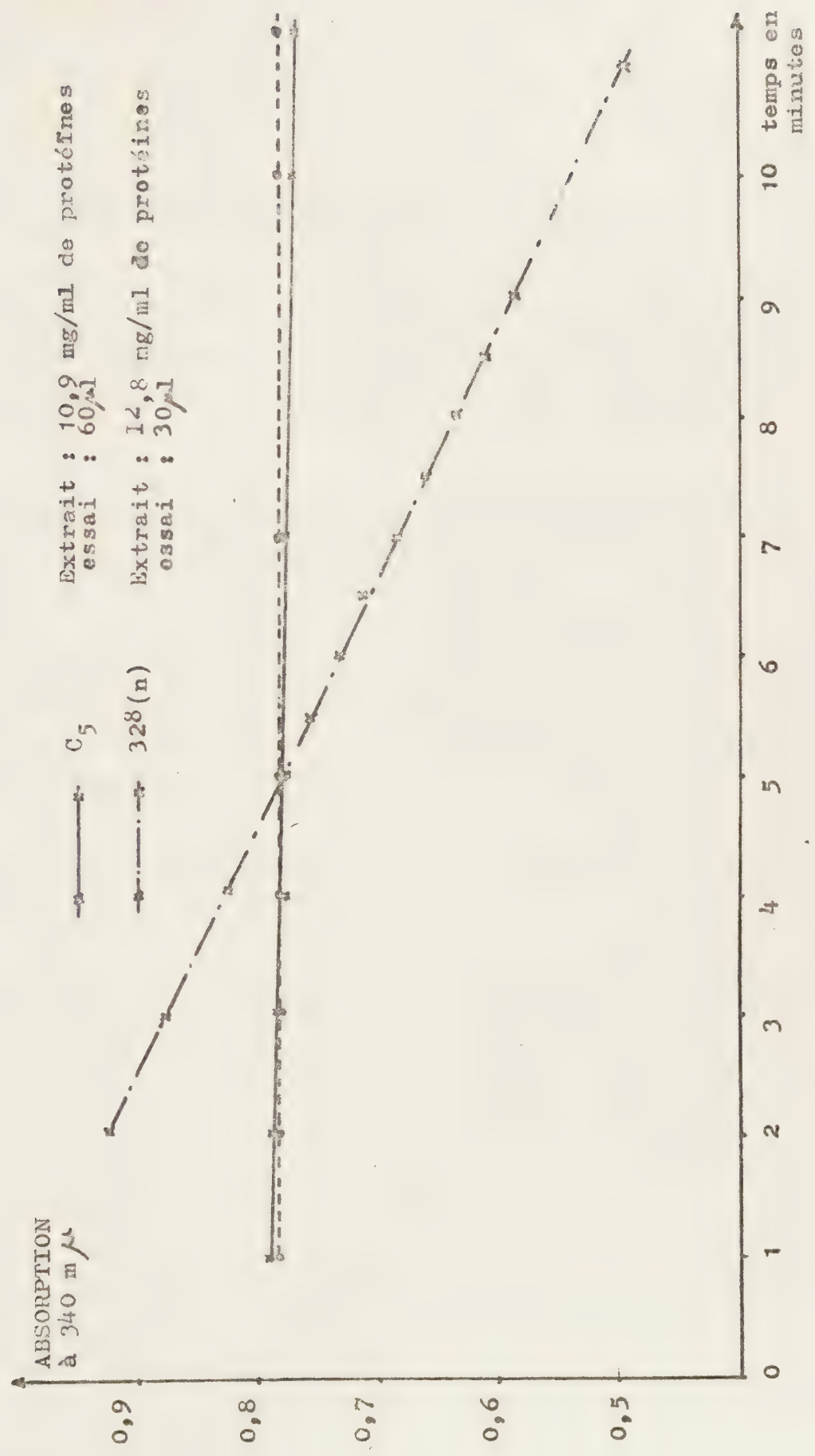
Les résultats du dosage sont portés en figure n° 26.
La souche C_5 est bien dépourvue de thréonine désaminase (E_1).

Tableau 7 : activité de E_1

Souches	activité E_1 n moles/min/mg de prot
328	1850
$C_5 (I^-)$	15

DOSAGE DE LA TIREONINE DESAMINASE

Souche mutante C 5



6) Remarque : obtention de mutants I⁻V⁻ diploïdes

Nous avons cherché à obtenir directement, compte tenu des difficultés exposées précédemment (page 35), des souches mutantes polyploïdes. Les premiers essais sur une souche diploïde seront mentionnés dans le chapitre "conclusion".

D) Corrélations entre activités enzymatiques de E₁, E₂ et la formation de dicétones volatiles

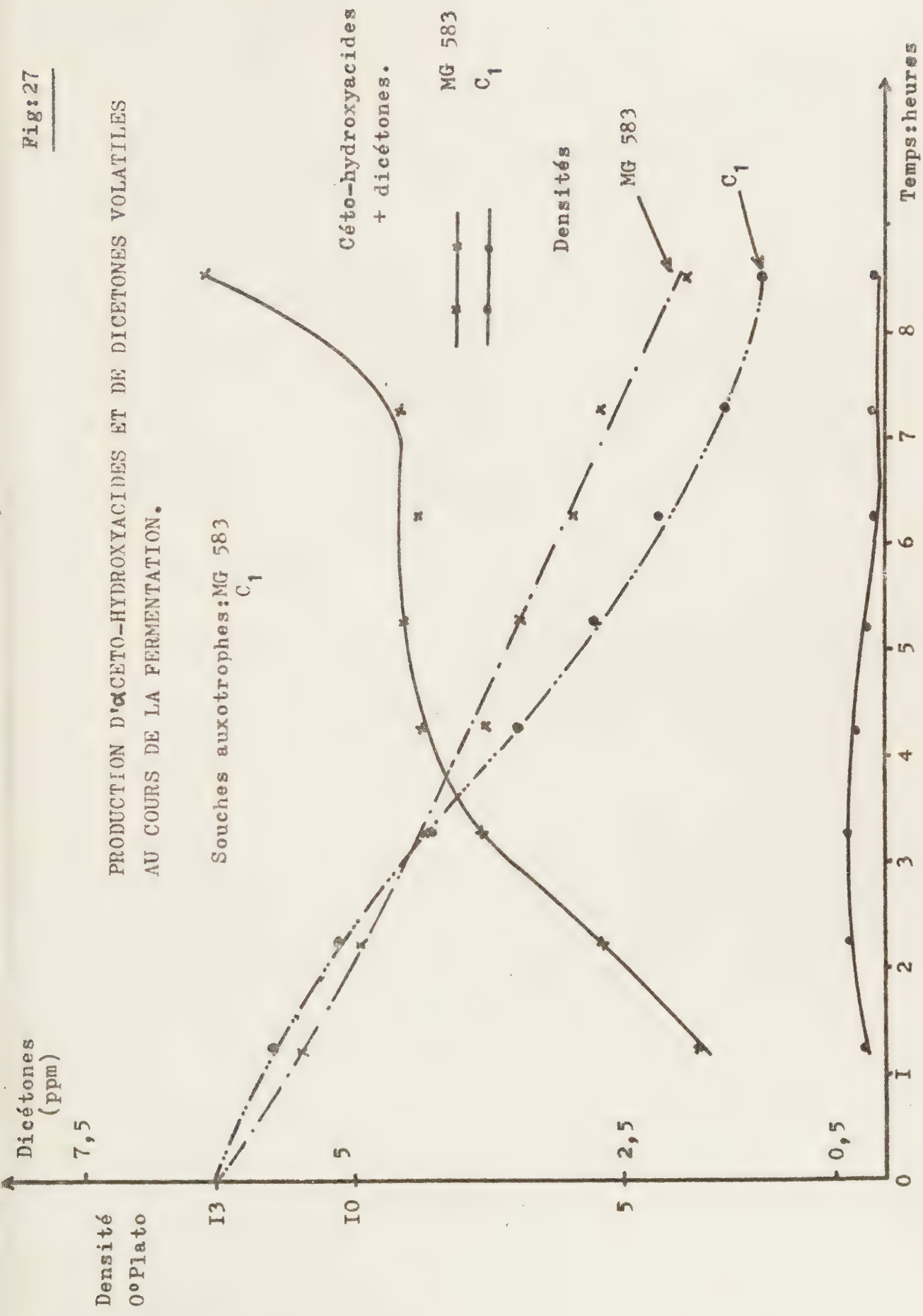
Les mutants I⁻V⁻ : Le mutant C₁ a été testé quant à sa production de dicétones au cours d'une fermentation avec un inoculum assis de levures (Voir IV). Nous avons d'abord analysé le milieu fermentaire à l'aide de la technique de dosage décrite au chapitre V § B.

-Dosage colorimétrique global des dicétones : les résultats sont portés en figure n° 27.

Il apparaît d'une manière très nette que le mutant C₁ ne produit au cours de la fermentation que des quantités négligeables de dicétones avec un maximum de 0,25 ppm. La souche sauvage produisait plus de 20 fois plus de dicétones avec un maximum de 7,5 ppm. Ces résultats mettent en évidence la dépendance entre production de cétohydroxyacides et de dicétones et taux d'activité de E₂.

Les faibles quantités de dicétones trouvées pour la souche C₁ peuvent s'expliquer par la présence de révertants qu'il est difficile d'éviter dans un inoculum aussi important (28 mg/ml).

PRODUCTION D'αCETO-HYDROXYACIDES ET DE DICETONES VOLATILES
AU COURS DE LA FERMENTATION.



- Dosage des dicétones par chromatographie en phase gazeuse avec capture d'électrons, de "head-space" de milieux fermentaires

En vue de confirmer ces résultats et pour tester la production de dicétones du mutant C_5 nous avons employé la technique de chromatographie en phase gazeuse. Les résultats présentés en figure n° 28, 29, 30, 31 ont été obtenus dans le laboratoire de Monsieur le Professeur Masschelein (C.D.R.I.A.) par Madame Ramos-Jeunhomme que nous remercions très vivement.

Mode opératoire

On injecte dans la colonne (T.C.D.P.) 3 ml de "head-space" de milieux fermentaires. Les concentrations de dicétones sont calculées par intégration des surfaces des pics. Un étalonnage préalable a été effectué. L'hexanedione a servi d'étalon interne dans tous les essais.

Les résultats reportés dans le tableau n° 8 représentent pour les souches 328 sauvages et les souches mutantes C_5 , C_1 , C_2 , les quantités maximum de diacétyle et de 2-3 pentanedione formés au cours de la fermentation d'un milieu contenant 10 % de glucose ensemencé à raison de 2 mg de poids sec de levure par ml.

Tableau 9 : Production de dicétones volatiles au cours de la fermentation

Souches employées	Diacétylo (ppm)	2-3pentanedione (ppm)
328	6,95	0,45
C ₁	0,05	0
C ₂	1,80	2,0
C ₅	1,7	0

Ces résultats sont repris dans les figures 28, 29, 30 et 31.

Discussion :

Les résultats obtenus en chromatographie en phase gazeuse confirment entièrement ceux obtenus par colorimétrie. L'absence d'une activité synthétasique (C₁) (voir fig. n°29) correspond effectivement à un défaut de formation des deux dicétones volatiles, ce qui confirme que le mécanisme de formation est unique et entièrement dépendant de la voie biosynthétique de la valine et de l'isoleucine.

Nous pouvons non seulement conclure que l' α AL est le précurseur immédiat du diacétylo, mais aussi que l' α AHB joue le même rôle vis-à-vis de la 2-3 pentanedione.

Il est à remarquer que les résultats obtenus avec la souche sauvage sont inférieurs à ceux obtenus dans le cas du mutant C₂, ce qui pourrait s'expliquer par le fait d'une



CHROMATOGRAMME DE
 L'EXTRACTION DE
 L'AMTLE D'ET
 L'AMTLE D'ET

Produit de la réaction
 de l'AMTLE

Injection
 ↓

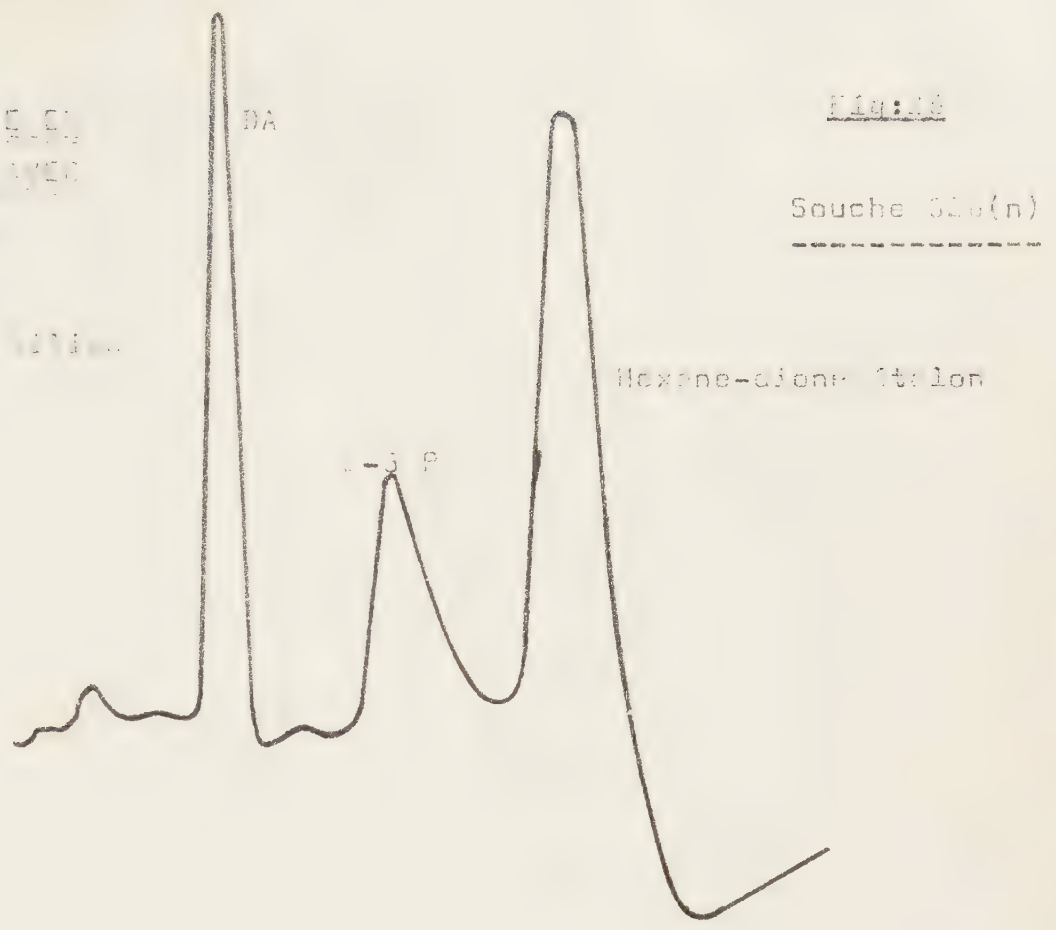


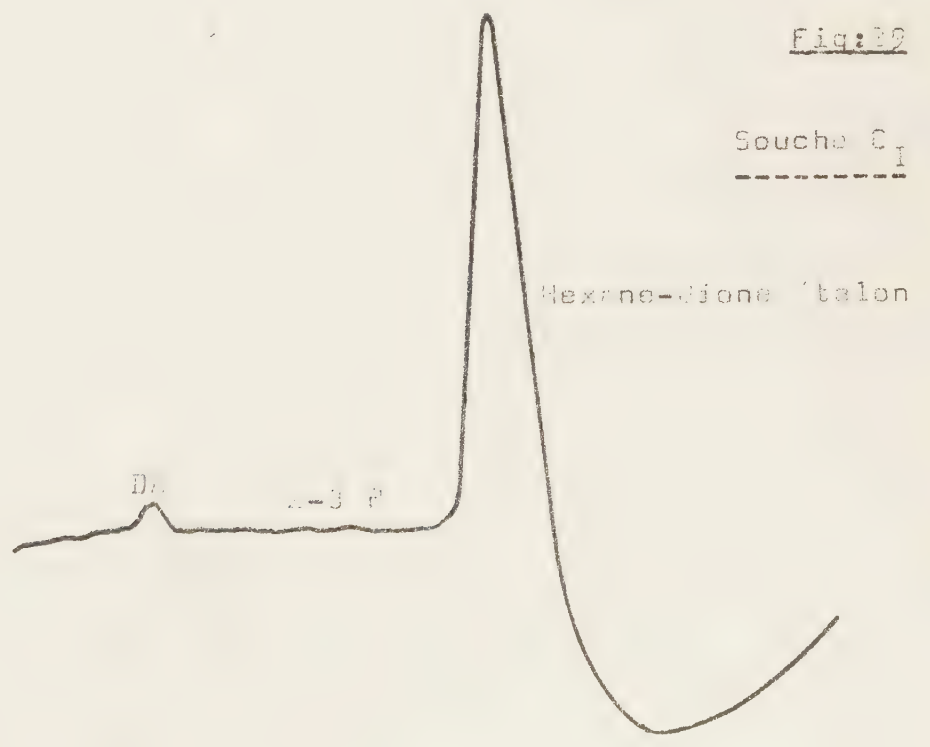
Fig: 18

Souche S26(n)

Fig: 19

Souche C₁

Injection
 ↓



Hexane-dione (talon)

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE AVEC CAPTURE D'e⁻.

Head-space de milieu fermentaire.

Fig:30

Souche C₂

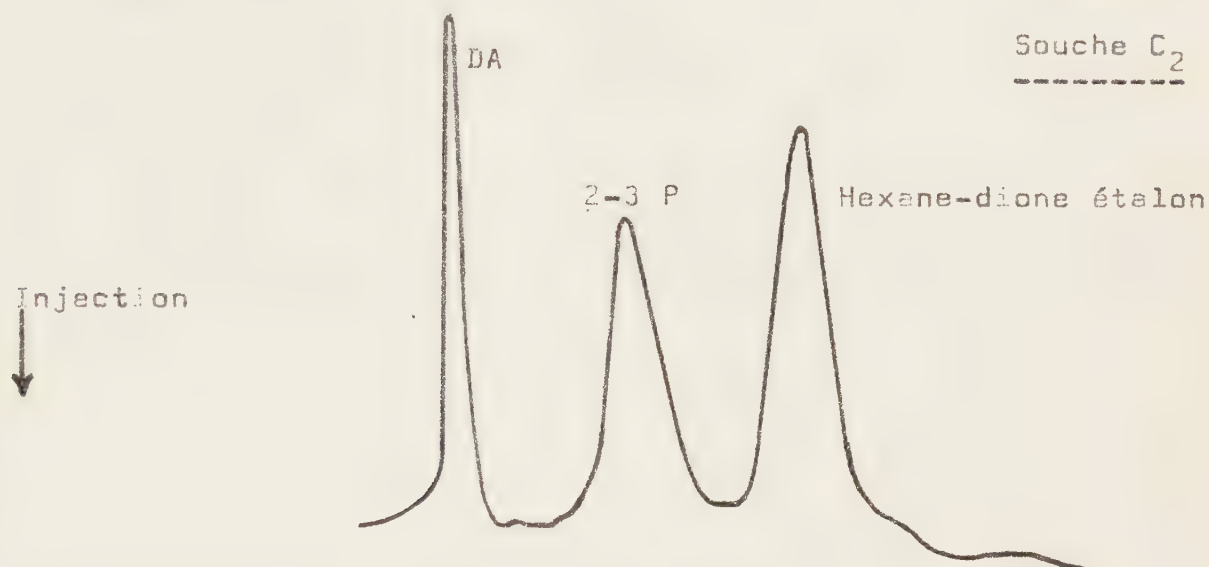
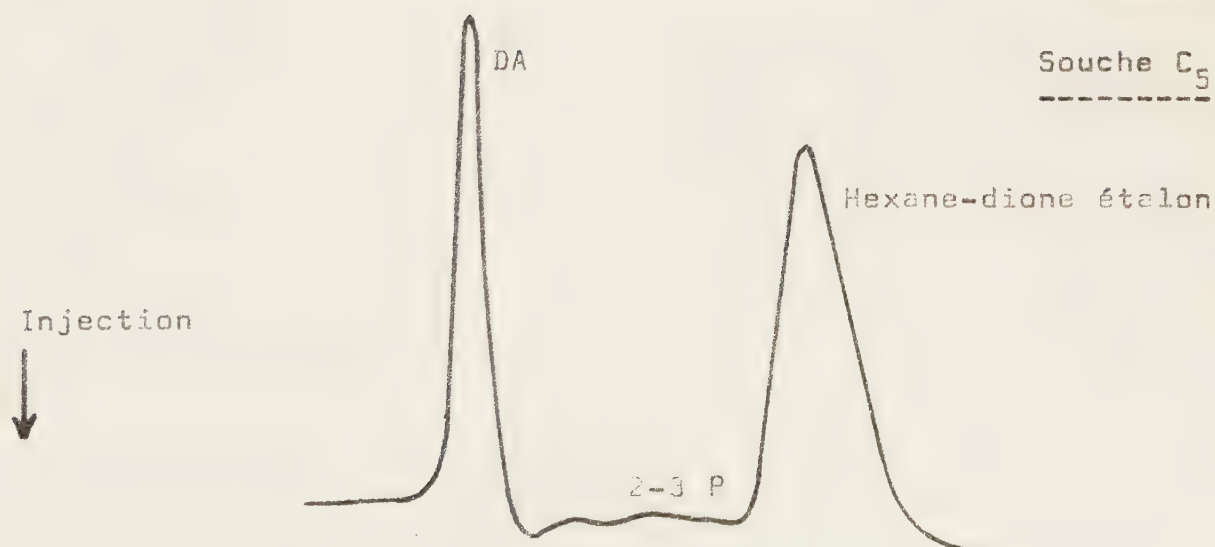


Fig:31

Souche C₅



part d'une éventuelle accumulation de α -cétohydroxyacides puisque la mutation se situe au-delà de la synthétase ; d'autre part B_2 du mutant C_2 est totalement déréprimée dans les conditions des fermentations effectuées (le milieu est supplémenté avec des quantités limitantes de valine et d'isoleucine).

On pourra ainsi comparer directement les productions de diétones des mutants C_1 , C_2 et C_5 , où les fermentations ont été effectuées dans les conditions strictement analogues.

3) CONTROLE DE LA FORMATION DES DIÉTONES

La formation des diétones comme nous l'avons montré au chapitre II est directement liée au taux d'activité de la synthétase (B_2).

Il restait indispensable de savoir les conditions qui déterminent l'activité de la synthétase. Nous avons donc cherché à évaluer les facteurs qui tendaient à diminuer directement son activité.

A) Action de la valine

De nombreux auteurs (14,34,28,8) ont mis en évidence l'action inhibitrice de quantités croissantes de valine sur la production de diétones volatiles dans le milieu

fermentaire. Nous avons répété ces expériences de fermentation (avec la souche *S. Carlsbergensis* 245) en présence de valine. Nous avons choisi les mêmes conditions de fermentation que celles exposées en figure 15. La production de dicétones et de cétohydroxyacides est réduite d'environ 30 fois quand le milieu contient 4 mg/ml de valine (Fig. n°32).

Au niveau enzymatique : pour préciser in vivo l'action du pool de valine, nous avons étudié sur des cellules perméabilisées l'inhibition de la synthétase en fonction de la concentration de valine (Fig. n°33). Pour 150 moles de valine la synthétase apparaît inhibée à 95 % à pH 7,2. E_2 est donc très sensible au rétro-contrôle de la valine ($K_i = 5.10^{-5}$ M d'après la figure 33)

D'autre part cette activité synthétasique est étroitement dépendante du pH (36). Ainsi à pH 6,7 que nous avons choisi comme se rapprochant le plus possible du pH intracellulaire, l'activité de E_2 n'est plus que de 40 % de l'activité au pH optimum 7,2. Nous avons montré pour ce même pH 6,7 que E_2 est moins sensible à l'inhibition de la valine : 79 % d'inhibition de l'activité pour 150 n moles de valine ; dans ces conditions de pH il reste toujours 20 % d'activité résiduelle quelque soit la concentration de valine employée (Fig. n° 33).

L'importance du pool intracellulaire de valine dépend directement du système de pénétration de cet acide aminé dans la cellule de levure. Nous avons cherché à avoir une estimation de cette pénétration.

Fig:32

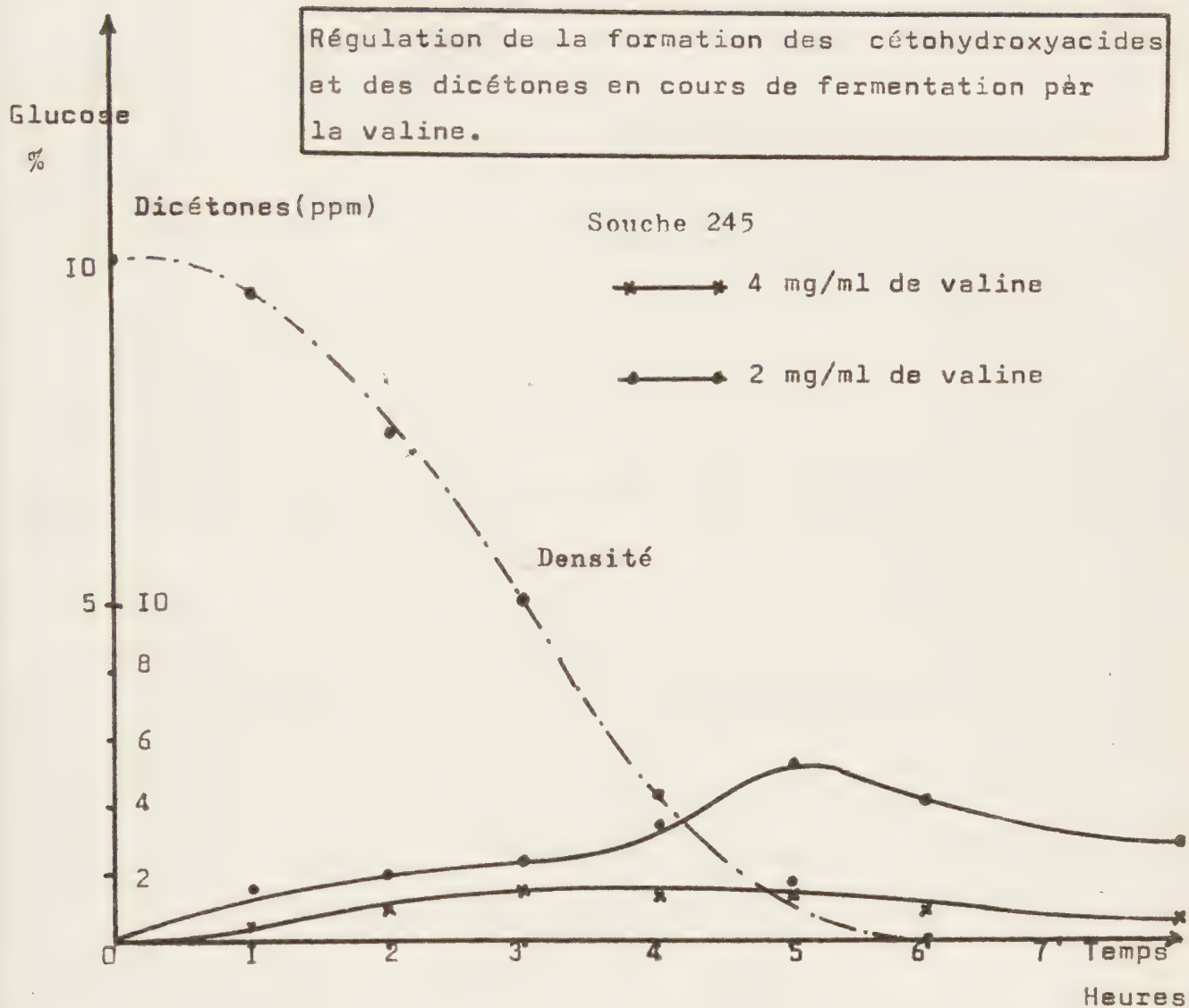
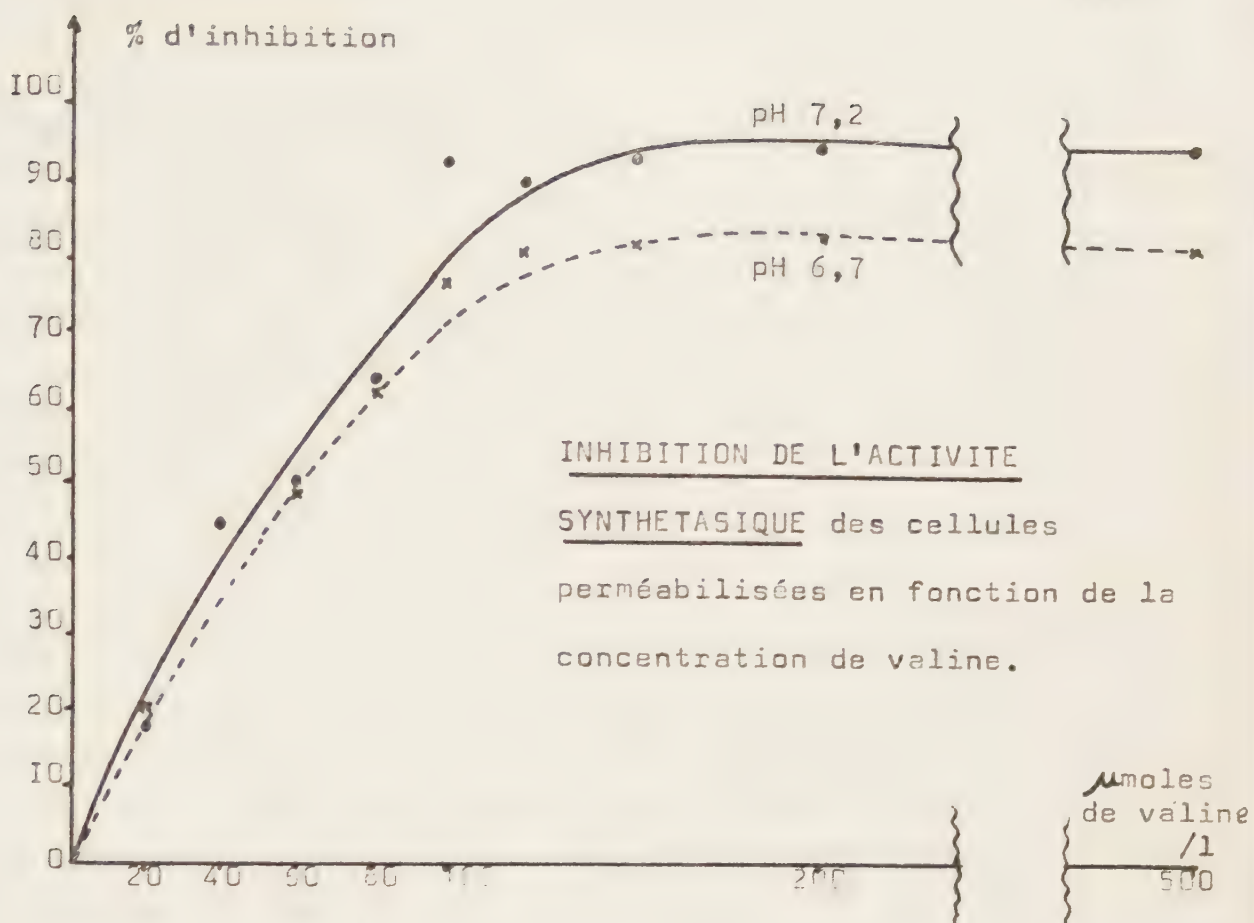
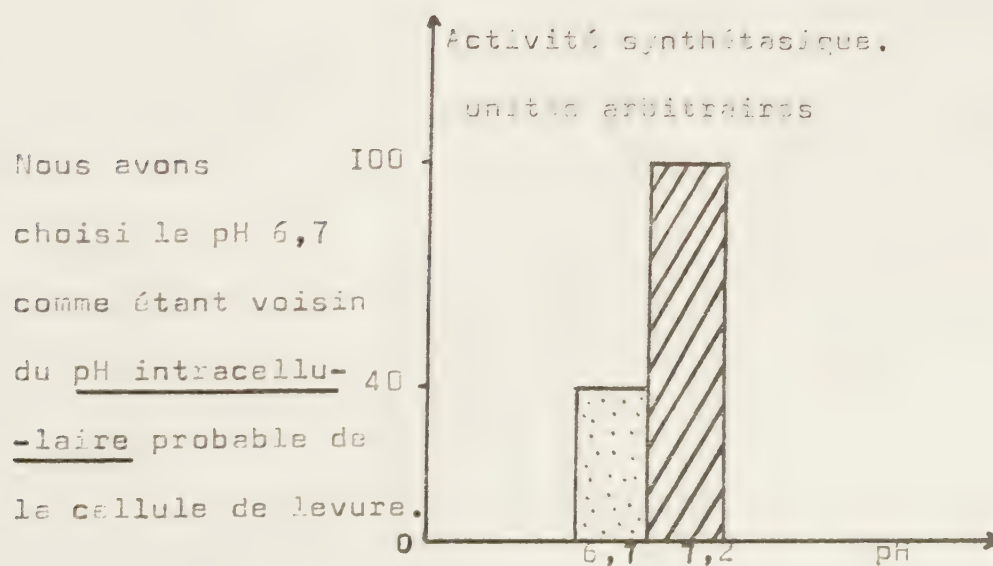


Fig:33



EFFET DU pH sur l'activité de la synthétase.



B) Pénétration de la valine dans la cellule de levure

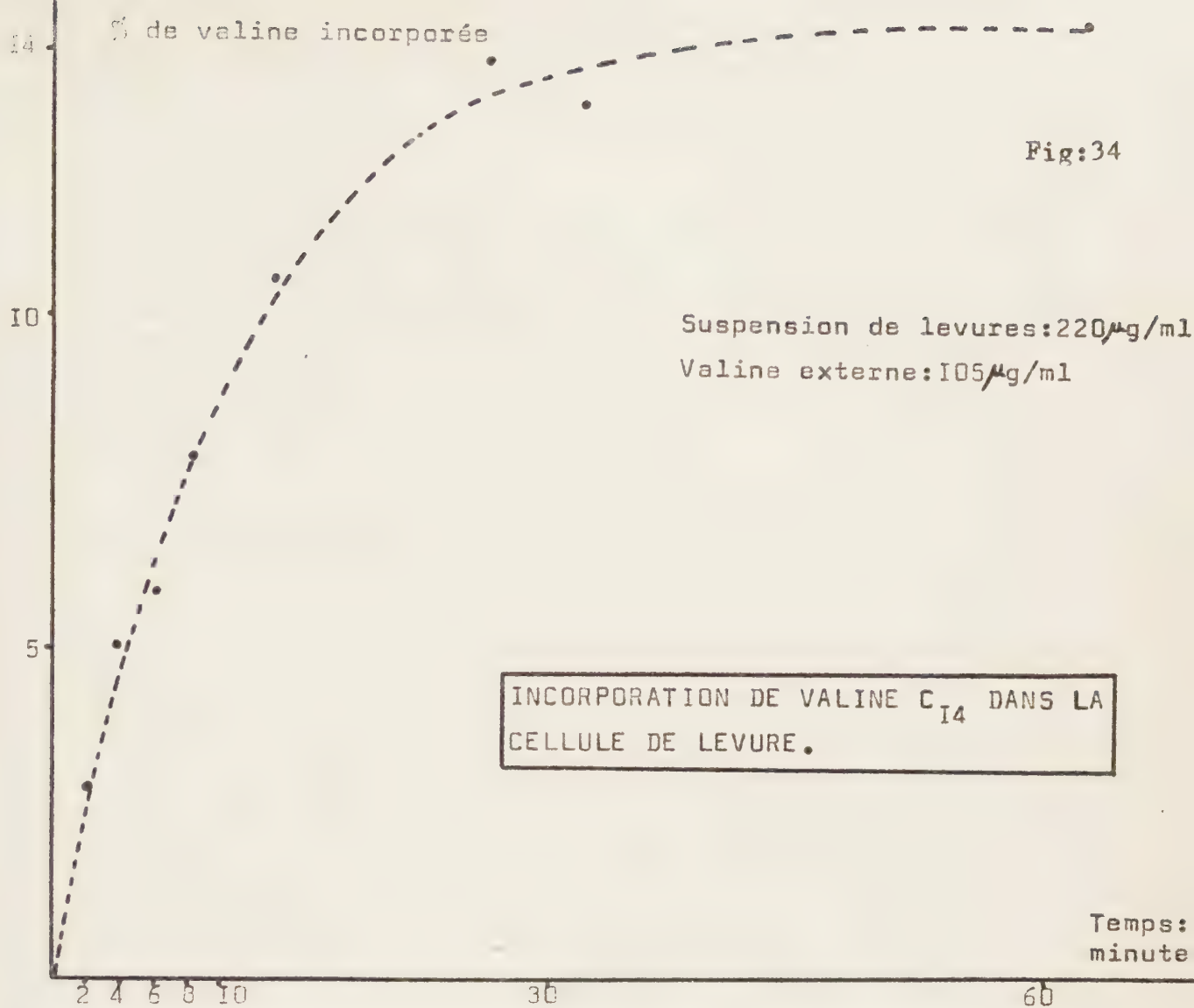
Nous avons vu (II) que Grenson avait mis en évidence pour les acides aminés neutres un double système perméasique.

Nous avons mesuré la vitesse de pénétration de valine C_{14} dans la cellule de levure en phase de croissance exponentielle sur milieu n° 2 (SO_4NH_4). Afin d'éviter l'incorporation de la valine du pool dans les protéines, les cellules étaient préalablement mises en incubation avec de l'actidione qui bloque la biosynthèse protéique.

Cette étude nous a permis d'établir un K_m apparent du système perméasique considéré. ($K_m = 0,29 \cdot 10^{-3}$ M Fig n° 35). L'étude cinétique portée en figure 35 n'est pas traduite en coordonnées de Lineweaver-Burk par une droite mais par un arc de courbe : on peut penser décomposer cet arc en deux droites représentant les cinétiques de deux systèmes perméasiques d'affinités différentes pour l'acide aminé considéré. Une étude plus poussée de cette cinétique pour de faibles concentrations de valine externe nous aurait probablement permis de distinguer les deux perméases en cause pour ce transport de la valine. Il est à noter aussi que le fait de doser des perméases sur plusieurs cultures en vue d'en établir la cinétique ne permet pas une reproductivité suffisante et expliquerait que les points expérimentaux ne soient pas rigoureusement indiqués.

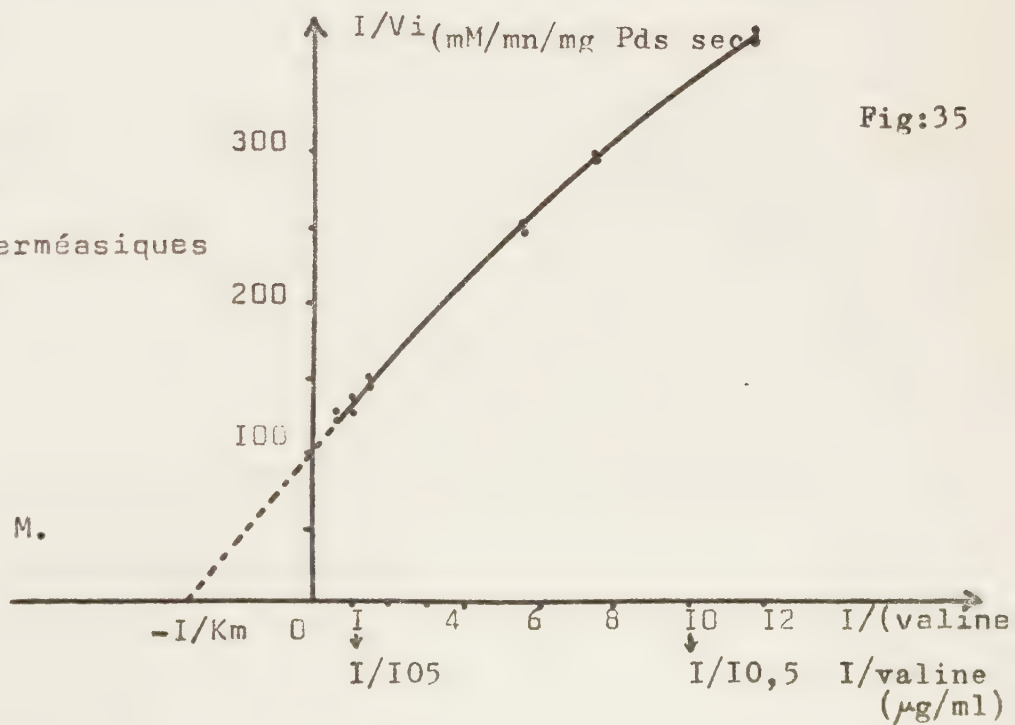
Au vu des résultats exposés en figure 35, et en fonction de ceux obtenus précédemment (chapitre V § A) nous pouvons remarquer :

dans un milieu contenant 105 mg/l de valine (ce sont des conditions analogues à celles existantes dans un moût), le pool de valine incorporé atteint en 5 minutes la quantité de 0,025 mg de valine/mg de poids sec de levure.



Détermination
du K_m apparent
des systèmes perméasiques
de la valine.
Souche 328.

$$K_m = 0,29 \cdot 10^{-3} \text{ M.}$$



De la quantité de valine nécessaire pour une rétroinhibition de la synthétase est d'environ 0,020 mg de valine/mg de poids sec de levure. On peut ainsi noter l'efficacité et la rapidité de la régulation par la valine à partir du moment où le système perméasique fonctionnera dans les conditions de fermentation.

C) Réduction du diacétyl

Le taux de diacétone du milieu fermentaire est en relation directe avec la capacité de la souche de levure de les réduire.

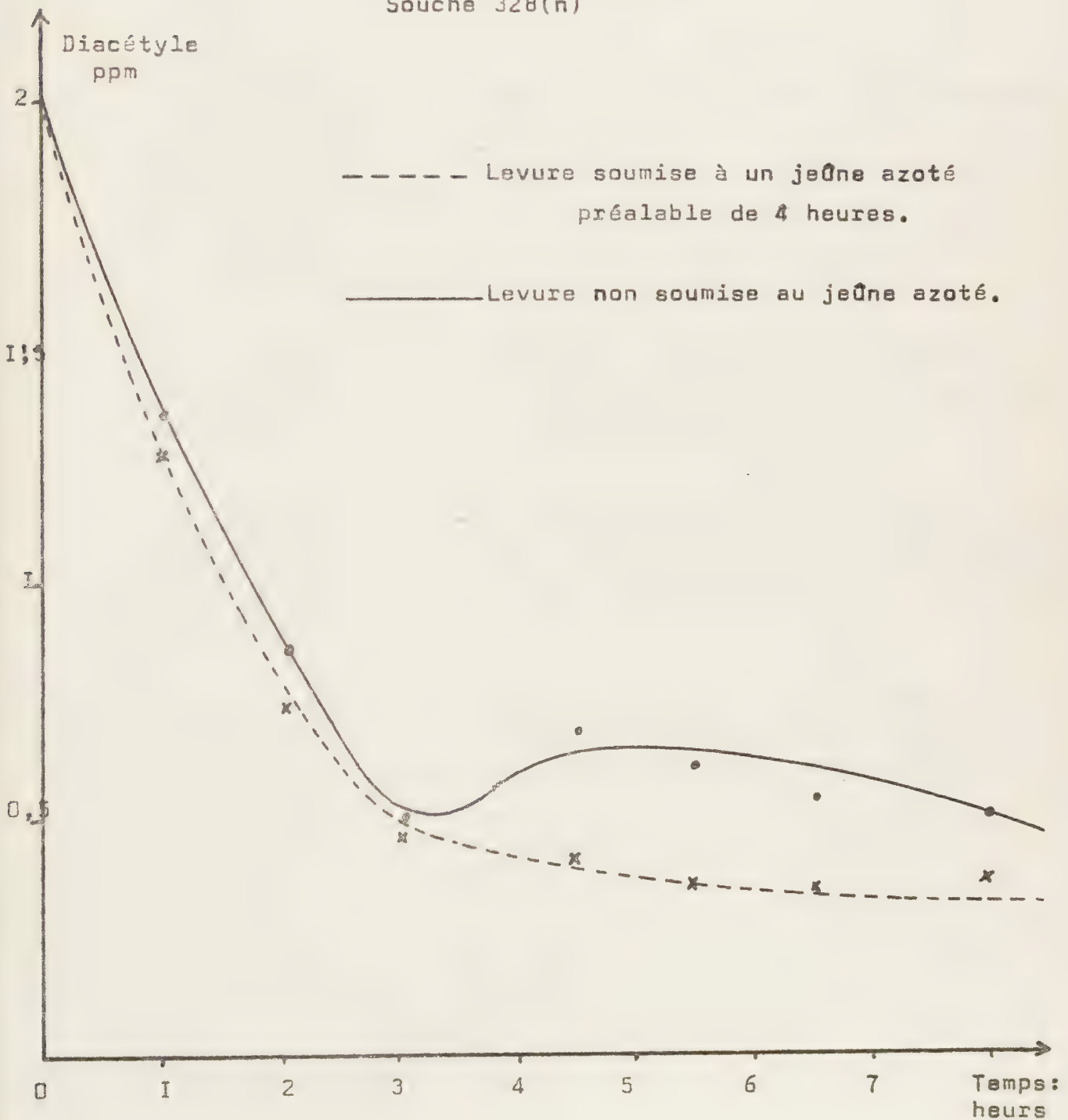
Elliker et coll. (58)(59) ont étudié les conditions de réduction du diacétyl par la diacétyl réductase en présence de NADH. Nous avons mesuré "in vivo" la réduction d'une solution de diacétyl (40 ppm) dans un tampon phosphate 0,1 M, par une suspension de levure prélevée au fin, la phase exponentielle de croissance. 80 % du diacétyl est réduit en 3 heures. Il est d'ailleurs difficile de définir dans ce cas la valeur exacte de cette vitesse de réduction, l'excrétion de 18 AL par la levure dans le milieu, intervenant conjointement.

Nous avons effectué une seconde expérience en tentant d'éliminer l'interférence citée ci-dessus. Le diacétyl était soumis à la réduction par une suspension de levures ayant subi un jeûne azoté préalable de 4 heures dans du yeast carbon base. Dans ce cas la réduction des diacétone apparaît être identique à celle trouvée dans la première expérience.

Dans les deux cas, on remarquera que la réduction du diacétyl restant après 3 heures (20 à 25 % du diacétyl total) est beaucoup plus lente.

REDUCTION DU DIACÉTYLE PAR LA LEVURE.

Souche 328(n)



CONCLUSION

DISCUSSION GENERALE

L'industriel brasseur soucieux d'accélérer les processus de fabrication, se trouvait confronté à de nombreuses difficultés sur le plan de l'arôme du produit obtenu après une fermentation continue ou discontinue accélérée. Une phase de maturation écourtée ou totalement supprimée ne permet pas dans ce cas de corriger les faux goûts obtenus.

L'un de ces faux goûts est constitué par la présence en quantités supérieures au seuil olfactif, de deux dicétones volatiles : le diacétyl et la 2-3 pentanedione.

Ces goûts anormaux de diacétyl sont d'autant plus gênants qu'ils apparaissent après la filtration de la bière au moment où les processus de réduction enzymatique ne sont plus possibles.

Il apparaît donc important de disposer de moyens d'action en vue de contrôler la formation de ces constituants. Pour ce faire il est indispensable d'en connaître le mécanisme de formation. Parmi les hypothèses proposées, celle mettant en jeu l'existence d'un α cétohydroxyacide précurseur de dicétones dans certaines conditions de températures de pH et de rH, apparaissait prépondérante. Cette hypothèse rendait compte d'ailleurs des nombreuses observations concernant la production des dicétones :

- instabilité des cétohydroxyacides lors d'une augmentation de température et de rH et pour une

valeur du pH voisine de 4,5

- régulation de la formation des dicétones par la valine qui est un effecteur allostérique de la synthétase, enzyme de condensation du pyruvate en α AL ou de l' α céto-butyrate et du pyruvate en α AHB.

Cependant le mécanisme proposé ci-dessus était-il le seul existant dans la cellule de levure ?

D'autre part, la formation de la 2-3 pentanedione empruntait-elle un chemin analogue à celle du diacétyl ?

En vue de répondre à ces questions, le seul moyen était de vérifier s'il existait une corrélation directe entre activité de la synthétase (E_2) et la production de dicétones volatiles. En effet si tel était le cas, nous pouvions espérer qu'un mutant dépourvu d'activité synthétasique ne produirait ni diacétyl ni 2-3 pentanedione. De la même manière un mutant dépourvu d'activité de la thréonine désaminase (E_1) ne produirait pas de 2-3 pentanedione. C'est la raison pour laquelle nous avons orienté cette étude vers la recherche et l'emploi de mutants auxotrophes pour la valine et l'isoleucine.

De tels mutants ont été isolés : une souche C_1 possède une activité synthétasique (E_2) deux cent fois plus faible que la souche sauvage. Une souche C_5 possède une activité de la thréonine désaminase (E_1) environ cent cinquante fois plus faible que la souche sauvage.

Une corrélation parfaite a été trouvée entre l'activité E_2 et la production de diacétyl et de 2-3 pentanedione d'une part, et l'activité de E_1 avec la production de 2-3 pentanedione d'autre part.

Ces résultats nous permettaient de contrôler totalement la production de dicétones au cours d'une fermentation à l'échelon laboratoire.

Cependant ces souches haploïdes de *S. Cerevisiae* ne sont pas utilisables dans l'industrie brassicole. En effet les souches adaptées aux conditions industrielles sont pour la plupart polyploïdes (66). Cette polyploïdisation proviendrait d'endomitoses ou de fusions sexuelles. Des cellules diploïdes peuvent présenter un caractère sexuel α ou $\times$ ("Les Levures de brasserie" 1. Biologie générale 1969-1970. C. BOURGEOIS - Ecole Supérieure de Brasserie - Nancy).

On peut penser à 3 types de démarche pour obtenir une souche de brasserie mutée en vue de la correction d'un caractère défavorable à une production de bonne qualité :

a)- déploïdisation d'une souche industrielle ; traitement des ségrégants haploïdes pour obtenir la souche mutante désirée, et reconstitution du type polyploïde.

b)- isolement à partir d'une souche haploïde du mutant désiré et reconstruction de la série polyploïde isogène de l'haploïde.

*sauvage

c)- à partir d'une souche polyploïde tenter d'obtenir directement les souches mutantes polyploïdes désirées.

Discussion des trois possibilités (a-b-c) énumérées ci-dessus

a) La déploïdisation d'une souche industrielle présente de nombreuses difficultés : (55 Cl. RAMOS-JEUNEHOME)

- faible taux de sporulation des levures industrielles.

- mauvaise viabilité des ascospores isolées.
- absence fréquente de formation de zygotes par croisement du ségrégant avec le "testeur" de signe connu.
- faible taux de sporulation de l'hybride :
ségrégant x testeur
- d'autre part l'analyse génétique de l'hybride formé par le ségrégant et le "testeur" s'est avérée impossible à cause du faible taux de viabilité des ascospores et de l'absence de ségrégation Mendélienne du signe.

b) Il est nécessaire dans ce cas de rechercher parmi les souches haploïdes une souche présentant un comportement brassicole acceptable tant en fermentation basse qu'en fermentation haute. Une telle souche caractérisée comme souche de brasserie (utilisation des sucres, floculence, adaptation maltose, formation de produits secondaires, efficacité fermentaire,.....) servirait de matériel de départ pour la production de mutants adéquats. On reconstitue la souche polyploïde qui présentera ainsi le caractère souhaité (par exemple : absence de dicétones volatiles).

c) Nous avons cherché à partir d'une souche diploïde (157 (2n)) à obtenir directement des mutants auxotrophes pour la valine et l'isoleucine. Après un traitement comportant deux mutagénèses successives (2 % d'EMS) nous avons isolé deux souches mutantes diploïdes dont une présentait la double auxotrophie (valine + isoleucine). Toutefois il est très probable que ce type de souche est également touchée quant à son génome en d'autres locus que + celui traduit dans le phénotype I⁻V⁻. Un essai d'une telle souche pour tester ses possibilités de fermentation sera nécessaire.

Dans tous les cas, restera posé le problème de la stabilité de la souche vis-à-vis du caractère aut. Nous n'avons pas abordé dans notre étude cette question.

Si l'utilisation de telles souches améliorées constitue des perspectives intéressantes pour l'avenir, il n'en reste pas moins vrai que dans l'immédiat, il s'avère indispensable de fixer des moyens d'action sur la base de nos connaissances actuelles.

Il apparaît ainsi que l'addition de valine au milieu fermentaire permet de réduire de manière rapide et appréciable la production de diacétone volatiles. D'après les résultats portés en figure 32 et 33 on remarque que la quantité de valine nécessaire pour inhiber l'activité de E_2 in vivo (Fig; n° 32) est nettement supérieure à celle que laissait prévoir la cinétique d'inhibition in vitro (Fig. n°33). On peut donc se poser la question suivante : tout le pool de valine de la cellule est-il en contact direct avec toute la protéine active E_2 ? Toute la valine du pool inhibe-t-elle toute la synthétase au taux maximum montré "in vivo".

D'autre part la levure possède une capacité importante de réduction du diacétyle en acétoïne (Fig. n°36). Cette possibilité de diminution de la concentration de diacétone n'existe plus après filtration. Il sera donc nécessaire que tout le diacétyle ait été réduit avant passage en cave de filtration, mais surtout à ce stade de la fabrication, la bière ne devra plus contenir de cétohydromyocides qui engendreront par la suite du diacétyle et de la 2-3 pentanodione.

Toutes ces études ne sont toutefois que partielles quant à leurs résultats.

Il semble bien que l'utilisation de souches améliorées présentera à l'avenir le meilleur moyen de contrôle de l'arôme.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - G.A.F. HARRISSON et A. COLLINS A.S.B.C. Proceedings 1968 83-87
- 2 - R. GAY Nouvelles perspectives dans l'analyse et le contrôle des constituants participant au goût et à l'arôme de la bière. Conférence - décembre 1969 - Association royale des anciens étudiants de l'I.S.F. de Gand
- 3 - H. SUOMALAINEN Aspects of yeast metabolism -Dublin 1968 1-29
- 4 - CH. A. MASSCHELEIN, H. JENARD, CL. RAMOS-JEUNEHOMME et A. DEVREUX D.B.C. Proceedings 1965 209-222
- 5 - J.E. AMORE - Symp. Foods 4th Oregon State University 1965 119-147
- 6 - L. KLAINEN J. Inst. Brewing 1966 72 50-56
- 7 - H. SUOMALAINEN 1968 Nature 220 792
- 8 - I. TAKASCHI et Als. 1968 A.S.B.C. Proceedings
- 9 - M.W. BRENNER et coll. 1963 Eur. Brew. conv. 233
- 10 - D.R. NAULE et coll. 1966 J. Inst. Brewing 72 488
- 11 - M.W. BRENNER et coll. A.S.B.C. Proceedings 1969 153
- 12 - G.A.F. HARRISSON et coll. J. Inst. of Brewing 1965 71 336
- 13 - R.A. LATHER et coll 1969 Master. Brew. Ass. Ameri. Soc vol 6 n°1 p.24
- 14 - OWADES et coll. Ass. Brew. Chem. 1959 22
- 15 - W.C. LAWRENCE 1964 Wall. Lab. Comm. 27 123
- 16 - E. SANDEGREN et L. BNEBO Wall. Lab. Comm. 1961 24 269
- 17 - R.S.W. THORNE Masters Brewers ass. Ameri. 1966 3 160
- 18 - T.H. AIN Brasserie 1965 338
- 19 - R.A. SPECKMAN et E.B. COLLINS Analyt. Biochem 1968 22 154
- 20 - M. GRIMBERGS et coll. Proc. 10th Conv. Australian and N.Z. sect. Inst. of Brewing 1968 23-34
- 21 - D. WATT et L.O. KRAHPITZ Fed. Proc. 1947 6 301
- 22 - E. JUNI J. Biol. Chem. 1952 195 715
- 23 - T.P. SINGER et J. PENSKEY B.B.A. 1952 2 316
- 24 - J. LE MAGNEN Vocabulaire technique des caractères organoleptiques et de la dégustation des produits alimentaires C.N.R.S. 1962

- 25 - L.F CHUANG et E.B. COLLINS J.Bact. 1968 95 6 2083
- 26 - DE LEY J.Gen.Micro. 1959 121-352
- 27 - E.JUNI J.Biol Chem. 1961 236 2302
- 28 - R.A. SPECKMANN et E.B. COLLINS J.Bact. 1968 95 174
- 29 - H.J STRECKER et coll. J.Biol.Chem. 1954 211 263
- 30 - H.SUOMALAINEN et A.J.A KERANEN J.Inst.Brew. 1967 73 477
- 31 - F.KOSIKOWSKI Edwards.Bro.Ann.ArborMich. 1966
- 32 - O.K SEBEK et C.I RANGLES Arch.Bioch.Biophy. 1952 40 373
- 33 - P.LAFFORT Interactions quantitatives dans un mélange d'odeurs :
niveau liminaire. Olfactologia 1968 1 1
- 34 - H.D PORTHO 1966 J.Inst.Brew 72 478
- 35 - K.F LEWIS et coll. J.An.Chem.Soc. 1958 80 4913
- 36 - H.DE.ROBICHON-SZULMAJSTER et P.T MAGDE Eur.J.Bioch. 1968 3 497
- 37 - Y.SURDIN et coll. B.B.A. 1965 107 546-566
- 38 - M.GRENSON et coll. B.B.A. 1966 127 325-338
- 39 - M.GRENSON B.B.A. 1966 127 339-346
- 40 - J.GITS et M.GRENSON B.B.A. 1967 135 507-516
- 41 - M.GRENSON et coll. J.Bact. 1970 103 3 770-777
- 42 - M.GRENSON Revue des fermentations et des industries alimen-
taires 1967 22 1 7-20
- 43 - M.JONES et coll. J.Inst.Brew. 1969 75 520
- 44 - H.DE.ROBICHON-SZULMAJSTER Bull.Soc.Chim.Biol. 1967 49 11
1431
- 45 - C.D BURROW et coll. J.Dairy.Scie.U.S.A. 1970 53 2 121
- 46 - DE CLERCK Manuel de Brasserie vol 1 70-75
- 47 - B.CABANE Symp.Groupe.Micro. E.D.C. Varèse 1970
- 48 - R.SNOW Nature 211 (1966) 206-207
- 49 - D.THOUVENOT - C.BOURGEOIS Ann.Inst.Past. 1971 (à paraître)
- 50 - B.CABANE D.E.A. Biochimie Faculté Sciences Nancy 1969
- 51 - S.H.KAKAR Genetics Princeton 1963 48 967-979
- 52 - S.H.KAKAR et R.P WAGNER Genetics Princeton 1964 49 213-222

- 53 - GJDEBSTEIN Monatschrift für Brauerei octobre 1964
- 54 - D.THOUVENOT thèse Docteur-Ingénieur Université de Nancy 1971
- 55 - Cl.RAMOS-JEUNEHOMME Symp.Groupe.Micro B.B.C. Varèse 1970
- 56 - J. et D.M.LEDERBERG J.Bact. 63 1952 399-406
- 57 - P.T.HAGEE et L.M.HEREFORD J.Bact. 1969 98 3 857
- 58 - T.M.TOLLS ; J. SHOEVERS, W.E. SANDINE et P.R.ELLIKER
Apply.Microb. 1970 19 649-657
- 59 - J.W.THOMPSON, J.SHOEVERS, W.E. SANDINE et P.R.ELLIKER
Apply.Microb. 1970 19 883-889
- 60 - H.HOLZER, M.BOLL et C.CENNAMO. Angewandte Chemie 3 (1964) 101
- 61 - J.M.WIANE - R.STORCK B.B.A. 1953 10 268
- 62 - R.R.FOWELL Acad.Press. Inc.New-York The Yearts Vol 1 (1969)
362
- 63 - P.ROINKAINEN, S.BRUMMER et H.SUOMALAINEN
Acta Chemica Scand. 24 (1970) 3404
- 64 - J.O.LAIPEN Symp.Soc.Gen.Microb. 1966 16 111
- 65 - F.HILGER Mémoire de licence spéciale 1969 C.E.R.I.A. Bruxelles
- 66 - WINDESH CoLogue des levures 1962 Nancy

S O M M A I R E

I - INTRODUCTION page 1

II - CONNAISSANCES ACTUELLES CONCERNANT LE MECANISME DE FORMATION
DES DICETONES VOLATILES page 4

A) Formation de l'acétoïne

B) Formation du diacétyle

C) Biosynthèse de la valine et de l'isoleucine et sa
régulation

D) Pénétration de la valine dans la cellule

III - OBJET DU TRAVAIL page 14

IV - TECHNIQUES EXPERIMENTALES page 16

V - RESULTATS EXPERIMENTAUX page 41

1) Rôle central des cétohydroxyacides dans le mécanisme de
formation des dicétones volatiles page 41

2) Etude du mécanisme de formation des dicétones volatiles
à l'aide de mutants auxotrophes page 56

3) Contrôle de la formation des dicétones page 80

VI - CONCLUSION

-:-:-:-:-

